



TITLE:

分裂酵母Dis3が均等な姉妹染色分体分離を保障するメカニズムの探求(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

村上, 博昭

CITATION:

村上, 博昭. 分裂酵母Dis3が均等な姉妹染色分体分離を保障するメカニズムの探求. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12835>

RIGHT:

分裂酵母 Dis3 が均等な姉妹染色分体分離を 保障するメカニズムの探求

村上 博昭

目次

要旨	-----	3
序論	-----	4-7
結果	-----	8-15
考察	-----	16-22
材料と方法	-----	23-25
参考文献	-----	26-34
謝辞	-----	35

要旨)

有糸分裂期において娘細胞に染色体を均等に分配することは、遺伝情報を子孫に正確に継承していくために極めて重要な過程である。分裂酵母 *dis3-54* 変異体は制限温度下で姉妹染色体分離に欠損を示す低温感受性の変異体として単離された。Dis3 タンパク質は真核生物で高度に保存されており、C 末端に RNaseII family に特徴的な RNA 分解ドメイン (RNB ドメイン) を有している。これまでに、染色体分配における RNA 分解酵素の役割についてはほとんど知見がなく、Dis3 タンパク質の分裂期における機能を明らかにすることは非常に興味深いと考えた。

本研究では、分裂期の *dis3-54* 変異体においてスピンドルチェックポイントが活性化され、Mad2 タンパク質依存的に細胞周期が停止することを示した。*dis3Δmad2* 二重変異体が姉妹染色体の不均衡分配を示すことから、Dis3 タンパク質が分裂期の動原体と微小管との安定な二方向性の結合の確立に重要な役割を担っていると結論した。続いて、Dis3 タンパク質の機能と *dis3-54* 変異体の変異部位について解析した。精製した Dis3 タンパク質を用いて、Dis3 タンパク質が *in vitro* において RNA 分解活性を有することを示した。そして、*dis3-54* 変異体の変異部位は RNB ドメイン中に存在し、*in vitro* の RNA 分解活性を低下させることを示した。分裂酵母 Dis3 タンパク質は RNA 分解酵素であり、*dis3-54* 変異タンパク質は RNA 分解活性が低下していると結論した。また、*dis3-54* 変異体ではセントロメアの中央領域 (*cnt*, *imr*) と外側領域 (*otr*) の遺伝子 silencing に欠損があり、制限温度下の *dis3-54* 変異体において *otr* 由来の転写産物が蓄積していることを示した。さらに、クロマチン免疫沈降法により、細胞内の Dis3 タンパク質の一部がセントロメア特に *otr* 領域と相互作用していることを示した。我々は、RNA 分解酵素である Dis3 タンパク質の活性が分裂期における安定な動原体-微小管結合の確立に必要であることを明らかにした。Dis3 タンパク質は RNAi 機構とは別の経路でセントロメア領域の silencing に寄与しており、その機能を通じて分裂期動原体機能に寄与しているのかもしれない。今後、その機能を理解することで、染色体分離メカニズムの新たな側面が解明されることが期待される。

序論)

1. 高等真核細胞の細胞分裂と分裂酵母の細胞分裂

細胞が増殖するためには細胞分裂が必須であり、子孫に正確な遺伝情報を継承するためには、細胞周期の複製期に倍加した遺伝情報を、2つの娘細胞に均等に分配しなければならない(総説として、Yanagida, 2005)。それら一連のイベントは細胞周期の有糸分裂期に起こる(図 1.)。分裂期には劇的な細胞内構造の変化が起こる。高等真核細胞ではその過程は6つに分けられ、分裂期中期から後期への進行に伴って姉妹染色体の分離が起こる(図 1. A.)。

分裂酵母でも基本的には上記の高等真核細胞と同様の分裂期イベントが進行する。しかし、分裂酵母の細胞分裂で特徴的なことは、核膜が終始崩壊しない閉鎖型であること、その過程が SPB と呼ばれる中心体様構造物の2点間の距離によって phase I~III の3つに分けられることである(図 1. B.)。

細胞分裂期には微小管から構成される紡錘体(スピンドル)によって姉妹染色分体は娘細胞へと分配される。紡錘体は動原体(キネトコア)と呼ばれる巨大タンパク複合体によって染色体と結合する。そのため、動原体の構築や機能は染色体分配に極めて重要である。動原体は染色体上のセントロメアと呼ばれる特殊な DNA 領域の上に構築される。セントロメア DNA と紡錘体との結合に異常が起こるとスピンドルチェックポイントと呼ばれる一連の機構により分裂期中期から後期への移行が抑制される(図 1. A.)。

2. 分裂酵母セントロメアの構造

分裂酵母のセントロメアは、3本の染色体それぞれ、配列や長さは異なるものの、よく似た特徴をもつ共通の構造から構成されている(図 2.)。その構造は、約 15kb の“中央領域”と、20~100kb もの“外側繰り返し配列(*otr*; outer repeat)”であり、中央領域はさらに *cnt*(center region)と *imr*(inner most repeat)に分けることが出来る(Nakaseko et al., 1986, 1987; Clarke et al., 1986; Fishel et al., 1988; Chikashige et al., 1989; Clarke and Baum, 1990; Hahnenberger et al., 1991; Murakami et al., 1991; Takahashi et al., 1991, 1992)。*cnt* は約 5kb の長さで、ヌクレオチドとして、A や T に富んでいる。*cnt* の両端には約 5kb の *imr* が左右に1つずつ存在する。*imr* の配列は染色体ごとに異なるが、それぞれの染色体の1対の配列はほぼ完全に一致している。*otr* は *dg*, *dh* とよばれる配列の繰り返しから構成されており、その配置、繰り返しの数、長さは各染色体で異なるが、そ

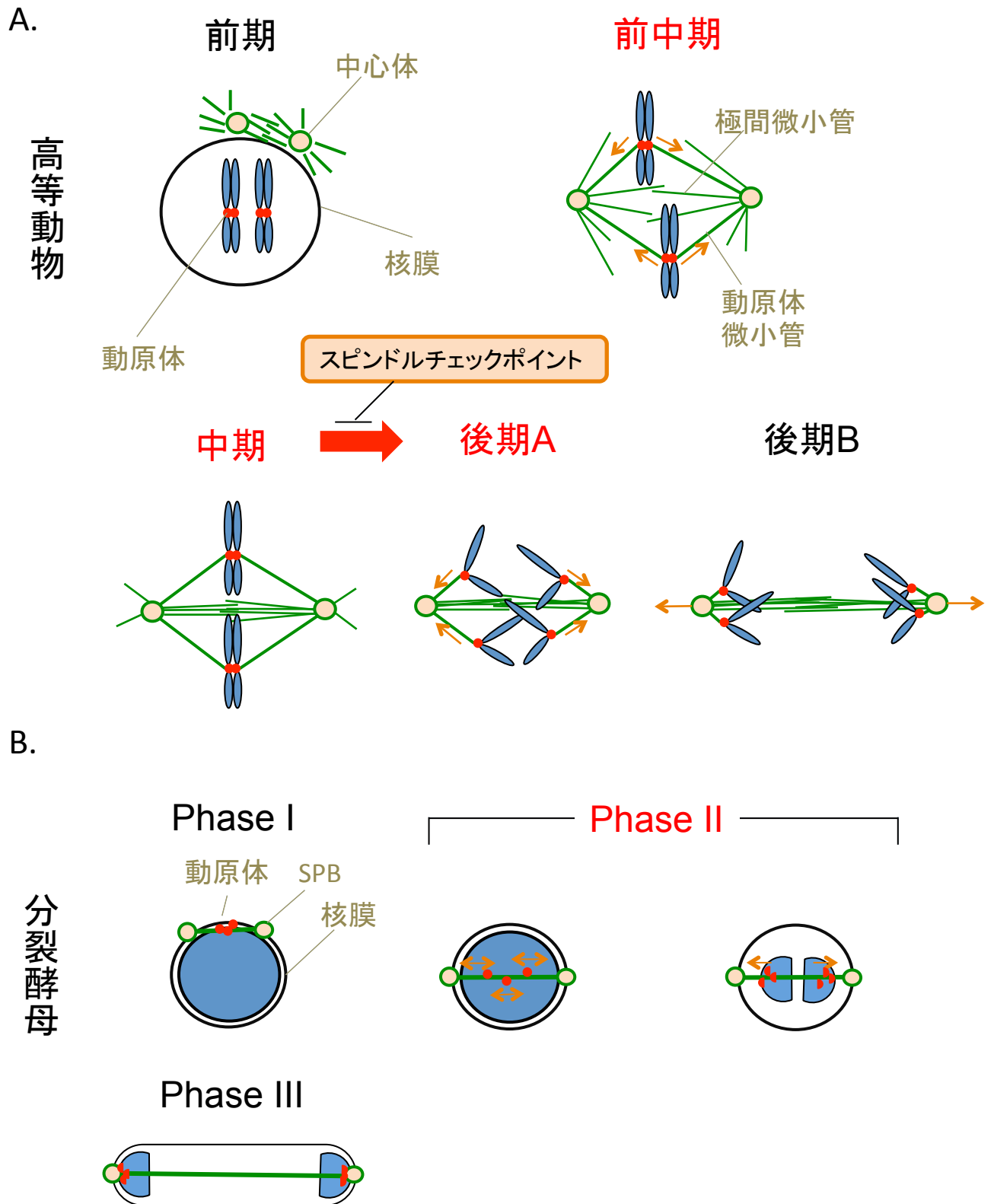


図1. 分裂期のイベント

A. 高等動物の分裂期。前期に凝縮した姉妹染色分体は前中期に動原体微小管に引かれ、スピンドルの長軸方向に沿って前後運動する。中期には、2方向性にスピンドルに結合した姉妹染色分体がスピンドル中央に整列する。後期に分離した染色体が娘細胞に均等に分配される。

B. 分裂酵母の分裂期はスピンドル動態から3つの期間に分けられる。Phase Iでスピンドルが形成され、Phase IIの終わりにかけてセントロメアがスピンドルの長軸方向に沿って前後運動する。Phase IIの終わりに各染色体の姉妹セントロメアが分離し両極に向かう。Phase IIIでは、スピンドルが伸長する。

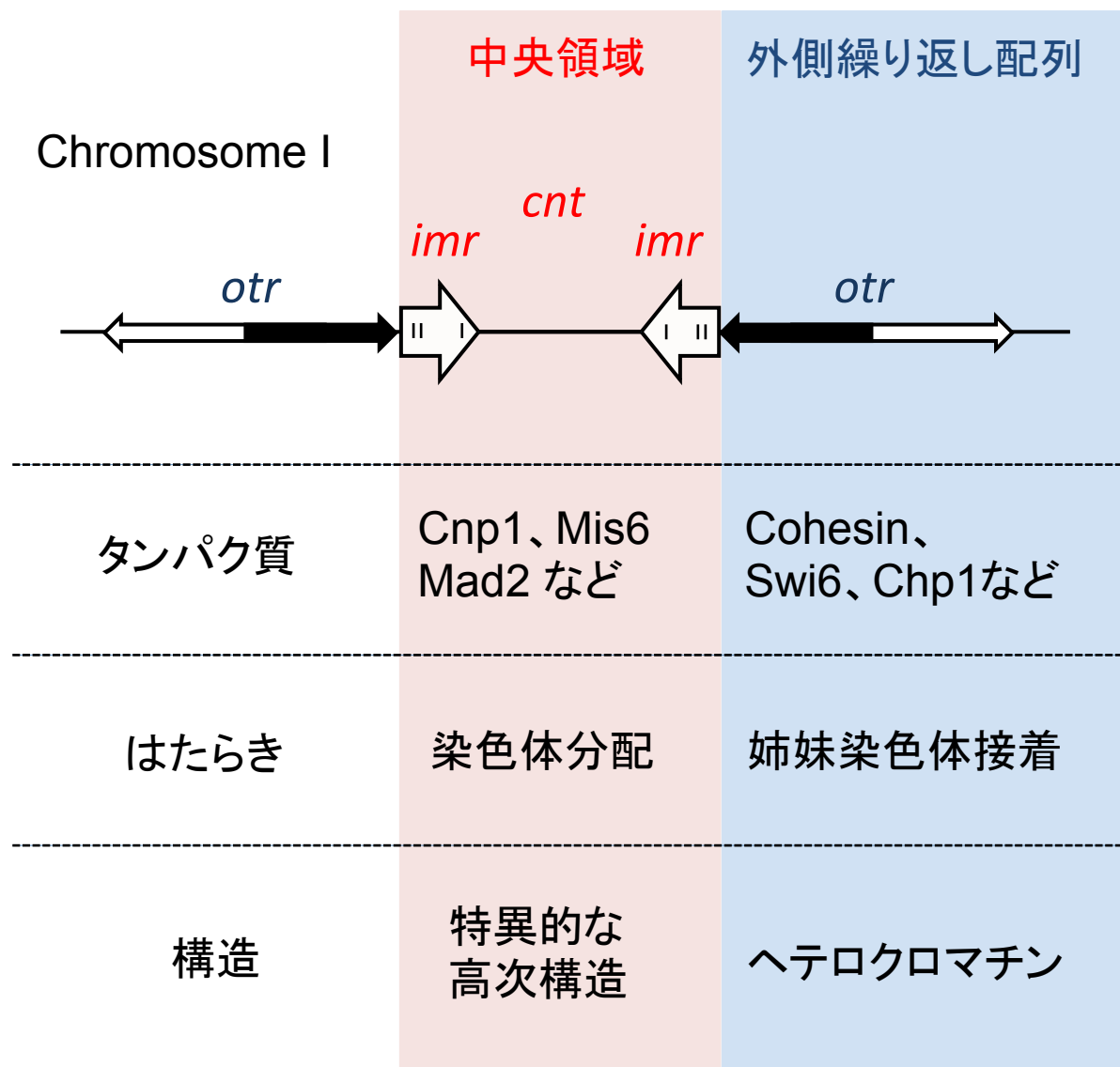


図2. 分裂酵母のセントロメア

分裂酵母のセントロメアは、約15kbの中央領域と、20-100kbの周辺繰り返し配列(*otr*)から成り、中央領域はさらに *cnt* と *imr* に分けられる。*cnt* は約5kbで、*cnt* の両極には約5kbの*imr* 配列が左右対称に1つずつあり、同じ染色体の左右の*imr* は100%同じ配列である。*cnt*、*imr* 配列は染色体間で異なる。中央領域は特殊なクロマチン構造を形成しており、この領域と相互作用するMis6、Mis12、Cnp1などのタンパク質がこの特殊なクロマチン構造の形成に必須である。*otr* 領域は、3本のセントロメアで共通の配列(*dg*、*dh*)の繰り返しから成っている。この領域はヘテロクロマチン構造を形成しており、相互作用するタンパク質としては、cohesin 複合体、Swi6、Chp1 タンパク質などが知られている。姉妹染色体の接着に重要な役割を有することが分かっている。

それぞれの配列自体はほぼ一致している。A や T に富むことや繰り返し配列により構成されることなどは、ヒトのセントロメアでこれまでに知られている特徴と非常に似ており、分裂酵母のセントロメアがヒトのセントロメアのよいモデルとなると考えられている理由でもある。

セントロメアのどの領域が染色体の安定な維持に必須であるかは、ミニ染色体を用いた解析により示されている。最小の人工染色体である Ch10 は第 3 染色体の腕部を γ 線照射により切断することで作製された (Niwa et al., 1986, 1989)。また、Gap filling 法により、多数の環状染色体が作製された (Matsumoto et al., 1990)。これらの解析の結果、*cnt*、*imr*、*otr* の 3 つの領域が完全なセントロメア機能に必須であることが示されている (Matsumoto et al., 1990; Takahashi et al., 1992)。セントロメア中央領域のみを持つ人工染色体は有糸分裂で高い維持率を示すことより、有糸分裂の染色体分配には中央領域が特に重要であることが分かった (Takahashi et al., 1992)。

セントロメア中央領域 (*imr*、*cnt*) と外側繰り返し配列 (*otr*) では、配列や繰り返しの数などの一次構造が異なるだけではなく、三次元的な構造も異なっていると考えられている。マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) による切断パターンが、*otr* では通常のヌクレオソームと同じく規則的なラダーパターンを示すのに対して、中央領域はスメア状の特殊な切断パターンを示すことが示されている (Polizzi and Clarke, 1991; Takahashi et al., 1992)。人工染色体を用いた詳細な研究により、スメア状の切断パターンは機能的なセントロメアにのみ存在し、セントロメア機能に必須であると考えられている (Takahashi et al., 1992)。中央領域に局在するタンパク質として、Mis6、Mis12~18、Cnp1 (分裂酵母 CENP-A) など多くのタンパク質が明らかにされている (Saitoh et al., 1997; Goshima et al., 1999; Takahashi et al., 2000; Hayashi et al., 2004; Shiroyiwa et al., 2011)。また、微小管結合タンパク質である Dis1、スピンドルチェックポイントタンパク質である Mad2、Bub1 など分裂期特異的に中央領域に局在することが示されている (Nakaseko et al., 2001; Toyoda et al., 2002)。

一方、セントロメア外側繰り返し配列 (*otr*) は転写が抑制 (silence) されたヘテロクロマチンとよばれる構造を有している。クロマチンの転写活動性はヒストンの N 末端 tail の翻訳後修飾と、様々なヒストン結合タンパク質により調節されていることが知られている。ヘテロクロマチンに特徴的なヒストン修飾として、H3K9me (ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のメチル化)、H3K4ac (H3 の 4 番目のリジン残基のアセチル化)、H3S10P (H3 の 10 番目のセリン残基のリン酸化)、調節タンパク質としては、ヒト HP-1 (heterochromatin protein-1) ホモログである Swi6 (Partridge RC., 2000) や H3K9 のメチル化酵素である Clr4 などが知られている。ヘテロクロマチンは染色体機能に重要な役割を持ち、セントロメアだけでなくテロメア、トランスポゾンもヘテロクロマチン化されている。セントロメアヘテロクロマチンは chromosome segregation、テロメアのヘテロクロマチンは chromosome

end integrity、トランスポゾンのヘテロクロマチンは transposon mobility control に必要である（総説として、Derek and Nakayama. 2012）。

3. 分裂酵母のセントロメア ヘテロクロマチン

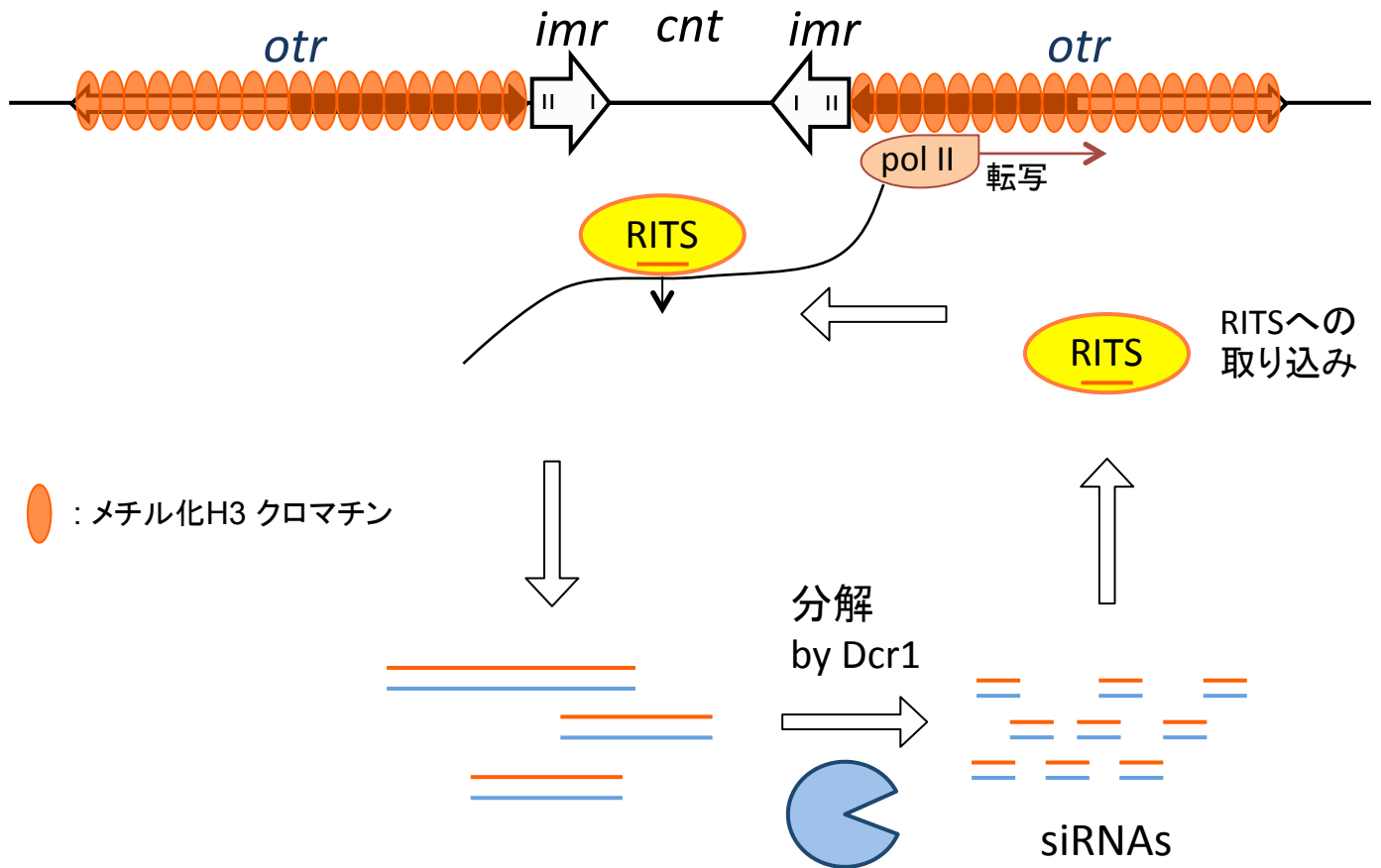
2002 年に Volpe らにより分裂酵母セントロメア *otr* 領域が転写されていることが明らかにされた（Volpe et al., 2002、Reinhart et al., 2002）。その後、一連の研究により、RNAi (RNA interference) と呼ばれる現象に関わる一群の因子 (siRNAs: short interference RNAs、Dicer、Argonaute、RdRP など) の分裂酵母ホモログがセントロメア *otr* 領域のヘテロクロマチン形成に必要であることが明らかにされた（総説として、Grewal SI. 2010、Derek and Nakayama. 2012）。次々と新たな RNAi 関連のタンパク質や複合体が同定され、以下のような silencing メカニズムのモデルが提唱された（図 3.）。

それは、セントロメアヘテロクロマチンが RNA polymeraseII により転写されることから始まる。転写された RNA は、転写 RNA と相補的な siRNA を有する RITS 複合体により認識され、Ago1 の slicer 活性により切断される。RNA dependent RNA polymerase (RdRP) を含む RDRC 複合体が、切断された RNA から二本鎖 RNA (dsRNA) を形成する。dsRNA は Dcr1 (ショウジョウバエの Dicer RNA endonuclease の分裂酵母ホモログ) により切断され、20-25 nt の siRNA ができる。siRNA は RITS 複合体に取り込まれる。Ago1 のクロモドメインが H3K9me と結合し、ヘテロクロマチンに RITS 複合体がリクルートされる。RITS 複合体は Ctr4 をリクルートし、Ctr4 は周辺のコヒストン H3 をメチル化する。また、RITS 複合体は pol II により転写された RNA を切断する。このようにヘテロクロマチン構造は非常に動的な構造であり、転写産物である RNA と RNAi 関連因子により形成される負のフィードバックシステムで調節されていると考えられている。

otr ヘテロクロマチン構造自体は生育に必須ではないことが分かっている。実際にヘテロクロマチン形成に必要なほとんどの因子 (Swi6、Dcr1、Ago1、Rdp1、Chp1 など) の遺伝子破壊株が生育可能である。しかし、それらの破壊株は低温下において分裂期に高頻度に lagging chromosome 表現型を示すことから、ヘテロクロマチンが染色体分配に重要な機能を果たしていると考えられている。その機能の一つとしては染色体合着に必要な cohesin をセントロメア *otr* 領域に enrich させる事が示されている。

4. *dis* (defective in sister-chromatid separation) 変異体の分離

分裂酵母 *dis3* 変異体は、制限温度下の 20℃において姉妹染色体が分離できず致死とな



Derek G and Nakayama J. 2012. *Develop. Growth Differ.* 54: 129-141

図3. RNAi機構によるヘテロクロマチン形成モデル

セントロメア *otr* 領域の転写はRNA pol IIIにより行われる (Kato et al., 2005)。RITS複合体のAgo1の slicer 活性により転写RNAが切断される。RITSと相互作用するRDRC複合体により、dsRNAが形成される。dsRNAはDcr1により分解され、siRNAs (short interference RNAs)になる。siRNAはAgo1と結合することでRITS複合体に取り込まれる。Ago1のクロモドメインを介してRITS複合体はヘテロクロマチン領域にリクルートされる。RITS複合体は、H3K9メチル化酵素Clr4やRDRCなどの複合体を *otr* 領域にリクルートする。Clr4は周囲のヌクレオソームのH3K9をメチル化する。メチル化H3K9には、クロモドメインを有するSwi6やClr4が結合する。Clr4はさらに周辺のH3K9を修飾しヘテロクロマチン領域を拡張する。

る *dis* 変異体の一つとして分離された (図 4. Ohkura et al., 1988)。Dis1 は微小管結合タンパク質であり、分裂期特異的に動原体に局在し、分裂期における動原体と動原体微小管との正常な結合に必要であることが示されている (Nabeshima et al., 1995、Nakaseko et al., 2001、Aoki et al., 2006)。Dis1 タンパク質はヒトを含めた真核生物において進化的に良く保存されている。Dis2 は type I タンパク質脱リン酸化酵素 (PP1) の catalytic subunit の一つである (Yamano et al., 1994)。最近の研究では Dis2 のヒトホモログは分裂期特異的に動原体に結合し、スピンドルチェックポイントの解除に機能することが示唆されている (Vanoosthuyse and Hardwick. 2009, Prinsky et al., 2009)。Dis1、Dis2 共に Cdc2 キナーゼに直接リン酸化され、Dis2 は抑制され、Dis1 は活性化するように調節を受けることが示されている (Yamano et al., 1994、Aoki et al., 2006)。Dis1 や Dis2 と異なり、Dis3 の分裂期の動原体や細胞周期進行における役割は全く明らかにされていない。

5. これまでに分かっている Dis3 タンパク質の機能

Dis3 は分子量 110kDa の比較的大きなタンパク質であり、RNase II に特徴的な RNB ドメインを有する (図 5.)。大腸菌を用いた *in vitro* での実験結果から、RNase II は 3' → 5' processive exoribonuclease 活性を有することが示されている (Coburn et al., 1996)。また、ヒトと出芽酵母の Dis3 ホモログである hDis3/Rrp44 は核や細胞質における RNA の成熟や分解を行う複合体である Exosome のコンポーネントとしても同定されている (Mitchell et al., 1997、Houseley et al., 2006)。Exosome は 10 以上ものコンポーネントから成る exoribonuclease 複合体であり、その基質には mRNA、snRNA、snoRNA、rRNA、tRNA など様々な RNA を含むことが知られている。また、大腸菌の RNase II の結晶構造が決定され、RNB 内の Motif I、Motif IV と呼ばれるモチーフの中の 4 つのアスパラギン酸残基と 1 つのアルギニン残基が活性中心であることが示された (Zuo et al., 2006)。Mg²⁺ イオンが Motif I の 1 つ目と 4 つ目のアスパラギン酸によりキレートされる。ヒトでは、これまでに分裂酵母 Dis3 ホモログとして、Dis3、Dis3L1、Dis3L2 が同定され、いずれも exoribonuclease 活性を有し、Dis3 と Dis3L1 は Exosome のコンポーネントとして働くことが示されている (Tomecki et al., 2010、Astuti et al., 2010)。Dis3L1 と L2 は同一遺伝子座に由来するスプライシングバリエーションである。また、興味深いことに、ヒト Dis3 は結腸癌の原因遺伝子の一つとしても同定されており、染色体分離や細胞周期進行に役割を有することが示唆される (Lim et al., 1997)。分裂酵母とヒトにおいて、Dis3 タンパク質は低分子量 G タンパクの一つである Ran の GEF である Pim1/RCC1 と直接相互作用することが示されている (Shiomi et al., 1998)。また、ヒトの疾病関連遺伝子の一つである lipin タ

野生株



dis 変異体

(*dis*; defective in sister chromatid separation)



Ohkura H et al., 1988. *EMBO J.* 7: 1465-73

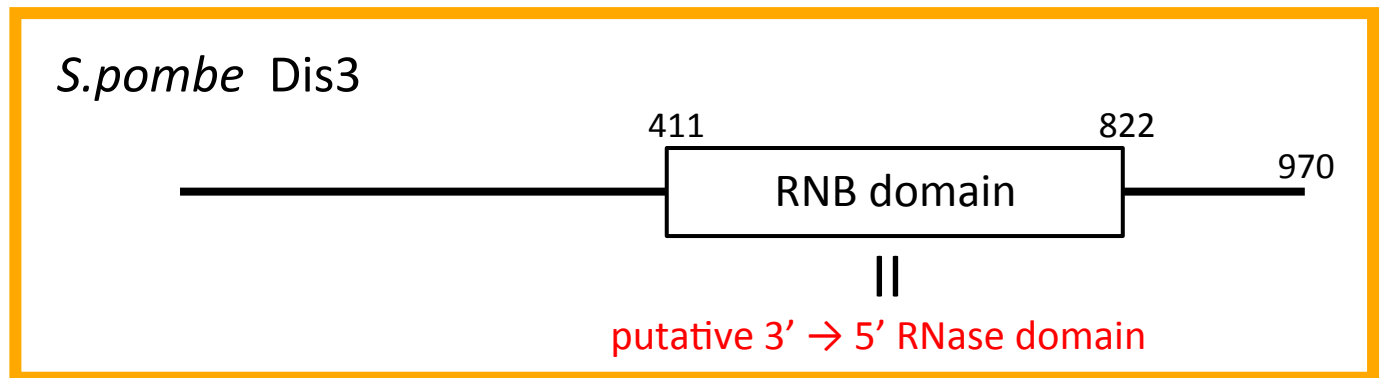
Dis1 protein: MT binding protein、M期特異的に動原体に局在

Dis2 protein: PPase、M期の進行、スピンドルチェックポイントの解除

Dis3 protein: RNase、M期での役割は不明

図4. *dis*変異体の単離とDis1-3タンパク質

*dis*変異体は、制限温度下の20℃において姉妹染色体が分離できず致死となる低温感受性変異体として分離された(Ohkura et al.,1988)。Dis1は微小管結合タンパク質であり、M期特異的に動原体に局在し、M期における動原体と動原体微小管との正常な結合に必要であることが示されている (Nabeshima et al.,1995、Nakaseko et al.,2001、Aoki et al.,2006)。Dis2はtype I 脱リン酸化酵素(PP1)のcatalytic subunitの一つである(Yamano et al.,1994)。Dis2はM期特異的に動原体に結合し、スピンドルチェックポイントの解除に機能すると考えられている。Dis3はRNA分解酵素ドメインを有するタンパク質であるが、M期における役割は全く明らかにされていない。



- 全長970アミノ酸
- 生育に必須(遺伝子破壊は致死)
- 進化的に非常に良く保存されている(ヒトからbacteria まで)
- 細胞周期を通じて核内及び細胞質に局在

Kinoshita N *et al.*, 1991. *M.C.B.* 11:5839-47

- 出芽酵母では巨大なexoribonuclease複合体である Exosome のコンポーネントの1つとして同定された

Mitchell T *et al.*, 1997. *Cell.* 91:457-66

図5. 分裂酵母Dis3タンパク質

Dis3は分子量110kDaの比較的大きなタンパク質であり、RNase II family に特徴的なRNBドメインを有する。RNBドメインは、3' → 5' processive exoribonuclease 活性を示すドメインと考えられている。

ンパク質のホモログである Ned1 は、Dis3 と Pim1 と相互作用する (Tange et al., 2002)。これらの結果から、Dis3 は核-細胞質間のタンパク質の輸送において何らかの役割を有していると予想されるがその詳細は明らかではない。

分裂酵母 Dis3 は細胞周期を通じて、細胞質と核内に存在する。また、遺伝破壊株は明らかな染色体分離欠損を示さず致死となることから、*dis3* 変異体は *allele* 特異的に分裂期表現型を示すと考えられており、その表現型を調べることで Dis3 タンパク質の分裂期の機能が明らかになることが期待される (Kinoshita et al., 1991)。

我々は、分裂酵母 *dis3* 変異体を詳細に解析することにより、RNA 分解酵素である Dis3 タンパク質の分裂期染色体分離における機能を明らかにする事を目的とした。

結果)

1. *dis3-54* 変異体では phaseII 以降の分裂期紡錘体が正常に形成されない

dis3-54 変異体（以下、*dis3* 変異体と省略）の分裂期表現型をより詳細に観察するために制限温度下 (20°C) にシフトダウン 4 時間後における染色体と分裂期紡錘体を観察した。染色体は DNA と特異的に結合する蛍光色素である DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を、紡錘体は微小管の構成タンパク質の一つである α 2-tubulin に対する抗体を用いて可視化した (図 6.A.)。これまでの報告の通り、*dis3* 変異体では、過凝縮した 3 対の姉妹染色体が観察され、それらの染色体はすべて分裂期紡錘体と重なって存在していた。

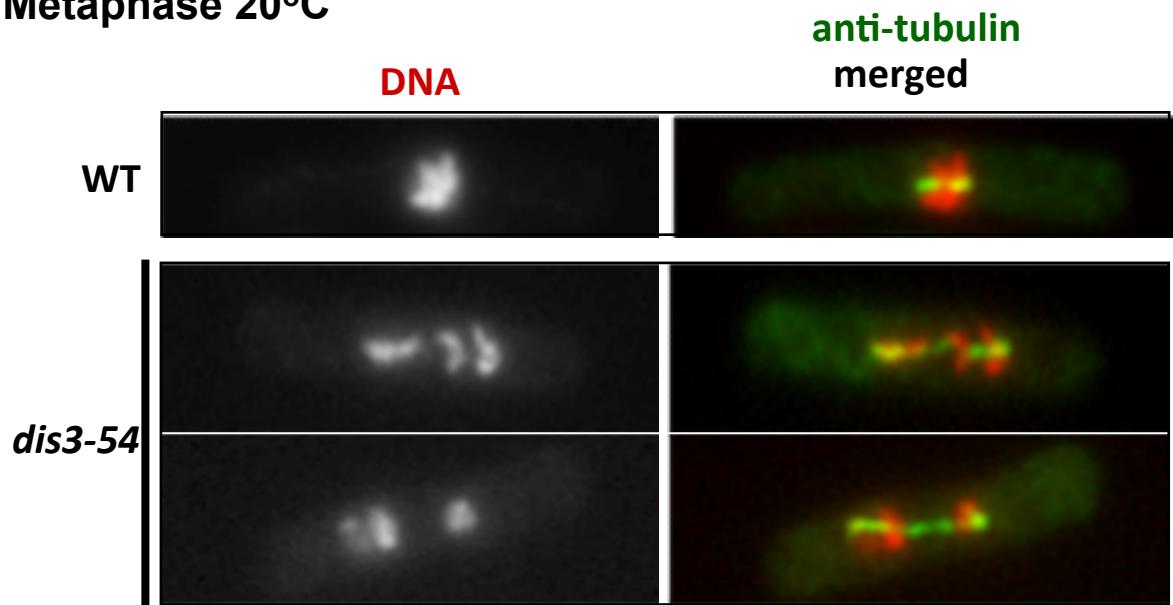
まず、野生株と *dis3* 変異体それぞれにおいて、紡錘体の長さを計測しグラフ化した。野生株における分裂期紡錘体長の分布はこれまでに報告されているものと同様であり、中期紡錘体と終期紡錘体の長さを示す 2.5 μ m と 8.0 μ m にピークの形成が認められた (Nabeshima et al., 1998)。それに対し、*dis3* 変異体の分裂期紡錘体長の分布は 4.0 μ m にピークを 1 つ認めるのみであった (図 6.B.)。次に、この約 4.0 μ m の紡錘体がどのように形成されるのかを明らかにするために、GFP 融合 α 2-tubulin を発現する遺伝子を染色体上に組み込んだ *dis3* 変異体を作成し、分裂期紡錘体の動態を生細胞で経時的に観察しグラフ化した (図 7.)。これまでの報告通り、野生株や許容温度下の *dis3* 変異体では、正常な phaseI、II (約 2.5 μ m)、III 紡錘体を形成した。それに対し、制限温度下の *dis3* 変異体では、2.5-3.0 μ m の phaseII 様の紡錘体が形成されるが、その後、観察時間内では正常な phase III 紡錘体は形成されなかった。観察した細胞の中には、約 4.0 μ m の紡錘体が崩壊するように見える細胞も認めた (図 7.A. cell #2)。

免疫染色と生細胞観察の結果から、*dis3* 変異体では分裂期中期以降の進行に異常を示し細胞周期進行が停止することが示唆された。

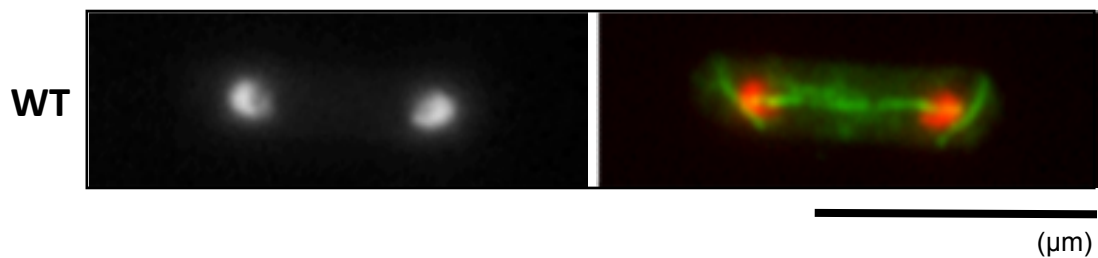
1.2 *dis3* 変異体では分裂期中期から後期への遷移が起こらない

dis3 変異体が分裂期中期で細胞周期を停止しているのか、もしくは終期以降で停止しているのかを明らかにするために、GFP 融合 Cut2/securin タンパク質を発現する *dis3* 変異体を作製した。Cut2/securin タンパク質は姉妹染色体の分離に必要な Cut1/separase の阻害因子であり、分裂期中期から後期への進行に伴って分解されることが分かっている (Funabiki et al., 1996)。野生株では Cut2-GFP のシグナルは前期から中期の細胞では染色体と重なる領域に認められ、後期へ進行した細胞ではそのシグナルは観察されない (図 8.)。それに対して、制限温度下の *dis3* 変異体では過凝縮した染色体を持つ全ての細胞で

A. Metaphase 20°C



Anaphase 20°C



B.

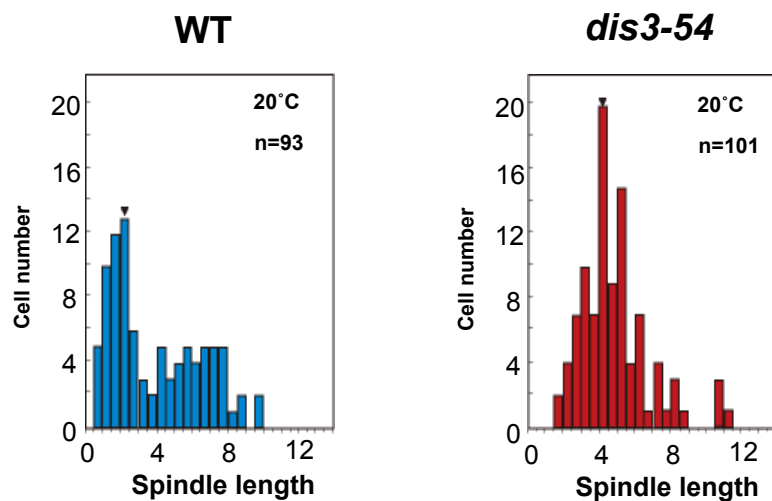


図6. *dis3*変異体ではphase II スピンドルが正常に形成されない

A. 野生株(WT)と*dis3*変異体それぞれを33°C許容温度下にて培養後、20°Cにシフトダウン後4hr目の細胞をメタノール固定し、抗チューブリン抗体を用いて免疫染色した。DNAはDAPI染色にて可視化している。merge像では、抗チューブリン抗体とDAPIのシグナルをそれぞれ緑、赤で示している。野生株では正常なphase IIとphase IIIスピンドルが観察されるが、*dis3*変異体では異常に伸長したphase II様のスピンドルを示す細胞が蓄積している。Scale bar=10μm。

B. 制限温度下における野生株と*dis3*変異体の分裂期スピンドル長の分布。20°C 4hr目の細胞を3% パラホルムアルデヒドにて固定後、抗Sad1(SPB タンパク質)抗体と抗チューブリン抗体により染色し、SPB間距離を測定した。下向き矢頭は、最頻値modeを示している。

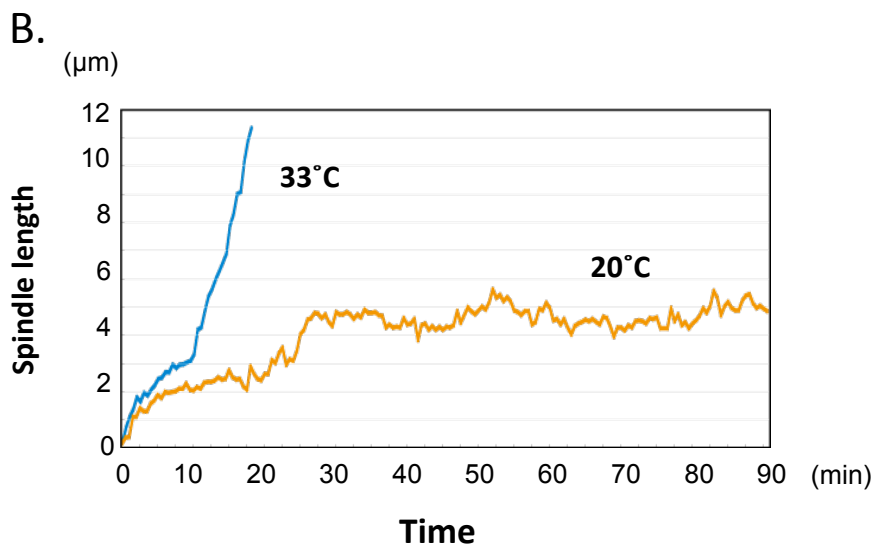
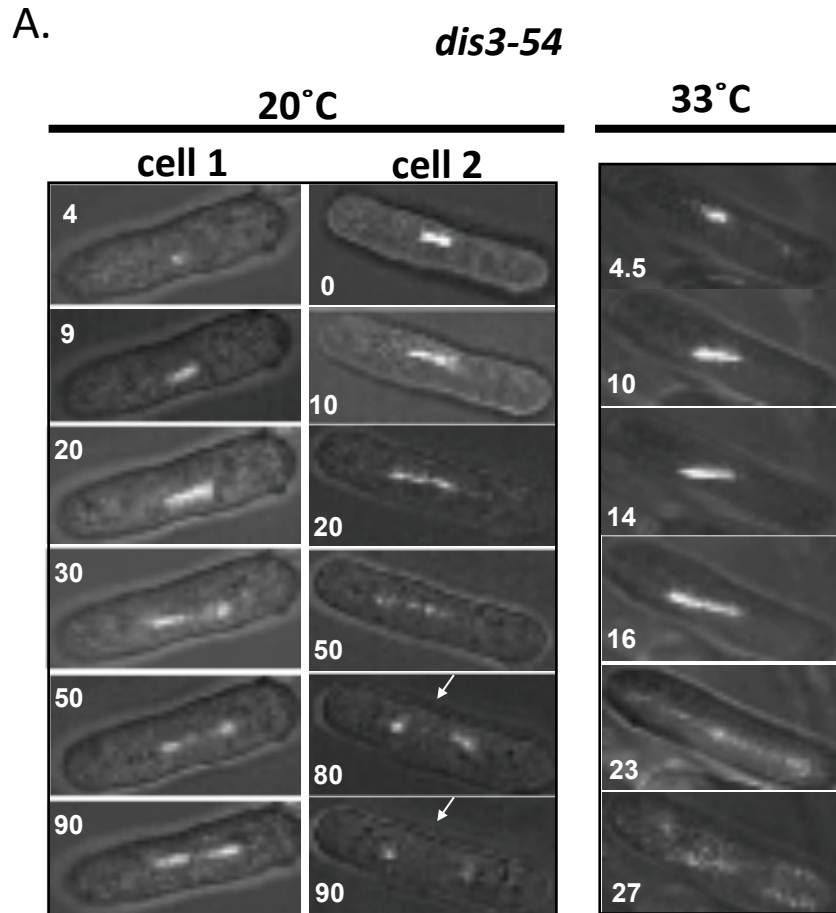


図7. *dis3*変異体ではphasell スピンドルが正常に形成されない

A. *mnt1*プロモータにて発現調整が可能なGFP融合 α 2チューブリンを発現する*dis3*変異体を作成し、分裂期のスピンドルを経時的に観察した。制限温度の20°C(左、cell 1とcell 2)と許容温度の33°C(右)それぞれにおいて、共焦点顕微鏡にて30秒間隔で最大90分間観察した。各パネルの数字は観察開始後の時間(分)を示している。cell 2の矢印は分裂期で長期間停止した*dis3*細胞において頻回に観察された崩壊したスピンドルを示している。

B. スピンドル長の経時変化。33°C(青線)、20°C(黄線)それぞれの温度下におけるスピンドル長を分裂期の開始点をtime=0としてプロットした。33°Cでは正常な分裂酵母のphasel->II->IIIスピンドルが観察されるが、20°Cでは約4 μ mでスピンドルの伸長が停止している。

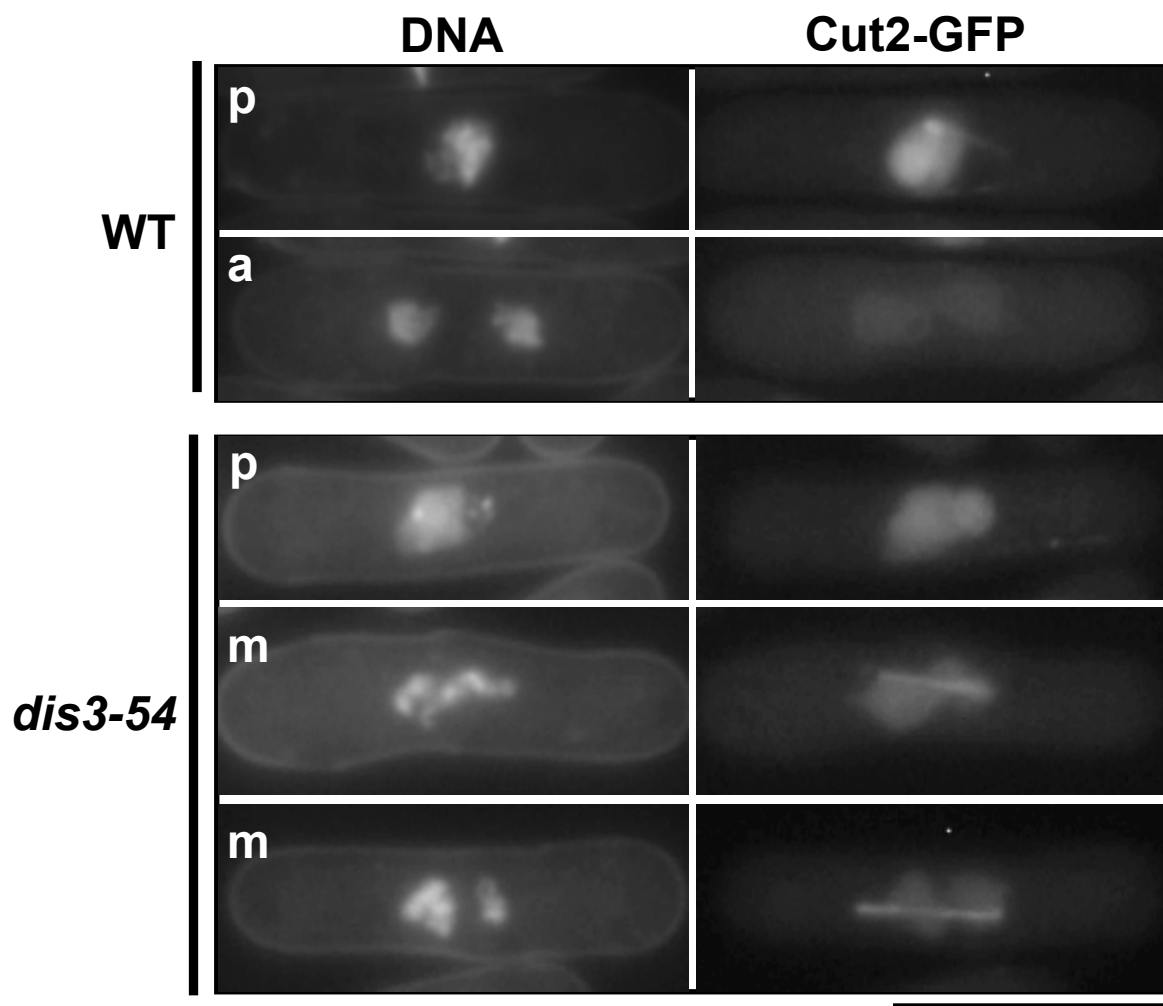


図8. *dis3*変異体では分裂期中期で細胞周期が停止している

GFP融合Cut2タンパク質を発現する遺伝子を染色体上に組み込んだ野生株と*dis3*変異体を作製し、EMM2液体培地で培養し20°Cにシフトダウンした。4hr後の細胞をHoechst H33342にてDNAを可視化し非固定下にて観察した。各細胞のパネルのp, m, aはそれぞれ前中期(pre-anaphase)、中期(metaphase)、後期(anaphase)を示している。野生株では、前中期の細胞で観察されるCut2シグナルは後期への移行とともに消失する。一方、*dis3*変異体では、全ての分裂期細胞でCut2シグナルが細胞内に観察され分裂期中期から後期への移行が起きていないことが分かった。Scale bar = 10μm。

核内に Cut2-GFP の強いシグナルが観察された。以上の結果から、*dis3* 変異体では分裂期中期から後期への遷移が起こっていないと結論した。

1.3 *dis3* 変異体の分裂期中期での停止はスピンドルチェックポイントタンパク質 Mad2 に依存している

dis3 変異体ではどのようなメカニズムにより分裂中期で細胞周期が停止するのであろうか。いくつかのチェックポイント機構が分裂期中期での細胞周期の停止を起こすことが分かっている。その中の一つであるスピンドルチェックポイント機構に着目し、*dis3* 変異体における分裂期中期での停止との関連を調べた。

まず、分裂酵母におけるスピンドルチェックポイントの構成因子である Mad2 との関連を調べるため、Mad2-GFP を発現する *dis3* 変異体を作製し局在を観察した (図 9. A.)。これまでの報告同様に、野生株では前中期と思われる一部の細胞にのみ染色体上に Mad2-GFP のシグナルが観察された (Toyoda et al., 2002)。それに対し、*dis3* 変異体では分裂期中期で停止した全ての細胞において、過凝縮した染色体上に強い Mad2-GFP のシグナルが観察された。同様の結果は、同じくスピンドルチェックポイントを構成する Bub1-GFP の観察でも得られた (図 9. B.)。

次に Mad2 タンパク質が *dis3* 変異体の分裂期中期での停止に必要なかどうかを調べるために、*dis3* 変異体と $\Delta mad2$ 破壊株とを交配し、*dis3\Delta mad2* 二重変異株を作製し、その表現型を観察した。*dis3\Delta mad2* 二重変異株では *dis3* 変異体と異なり過凝縮した姉妹染色体は観察されず、細胞の両端まで伸長した紡錘体を示す細胞が多数観察された (図 10. A.)。

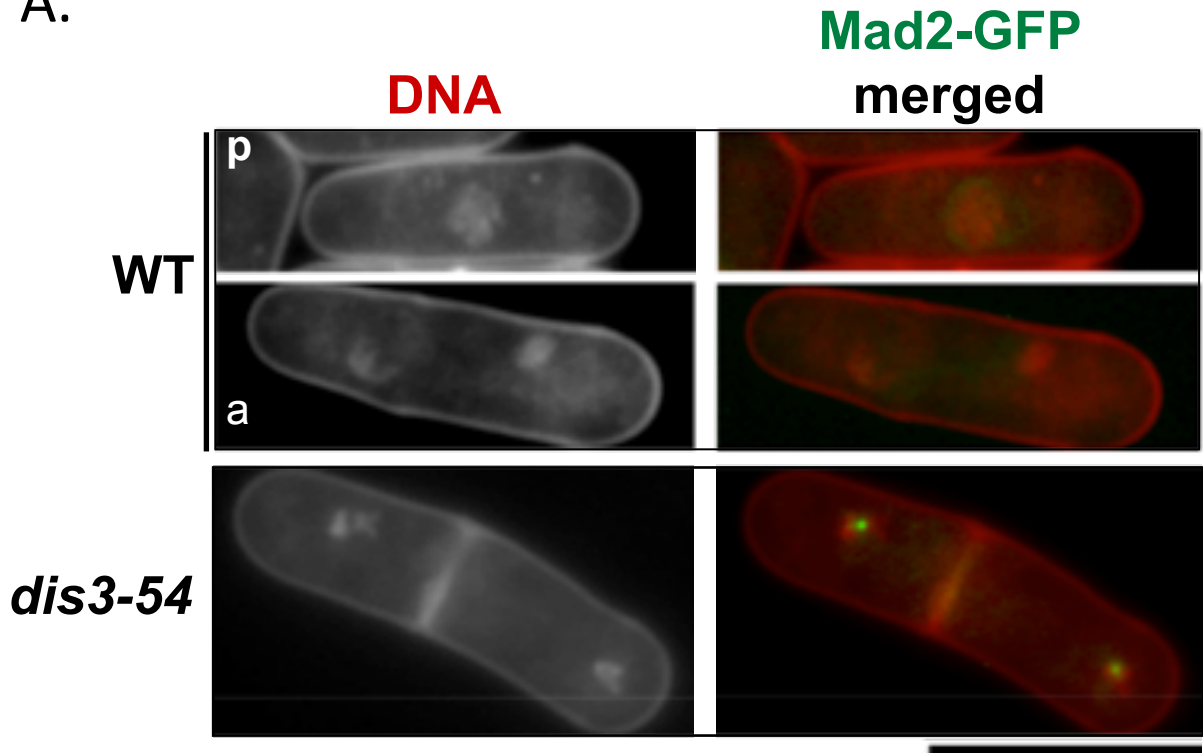
また、Cut2-GFP を発現する *dis3\Delta mad2* 二重変異株を作製し、その細胞内シグナルを観察したところ、伸長した紡錘体と分離した核を有する細胞では、すべて細胞内の Cut2-GFP シグナルが消失していた (図 10. B.)。

以上の結果は、*dis3* 変異体の分裂期中期での停止にはスピンドルチェックポイントタンパク質 Mad2 が必要であることを示している。

1.4 *dis3\Delta mad2* 二重変異株では均等な姉妹染色体の分配が欠損している

次に *dis3\Delta mad2* 二重変異株の分裂期表現型をより詳細に観察したところ、約 60%の細胞が大小核表現型を示すことが分かった (図 11. A)。大小核表現型は姉妹染色体の不均等分配を示す表現型であり、セントロメアタンパク質の変異体である、*mis6*、*mis12-18*、*cnp1* 変異体などで観察されることが示されている (Saitoh., 1997、Goshima., 1999、Takahashi et

A.



B.

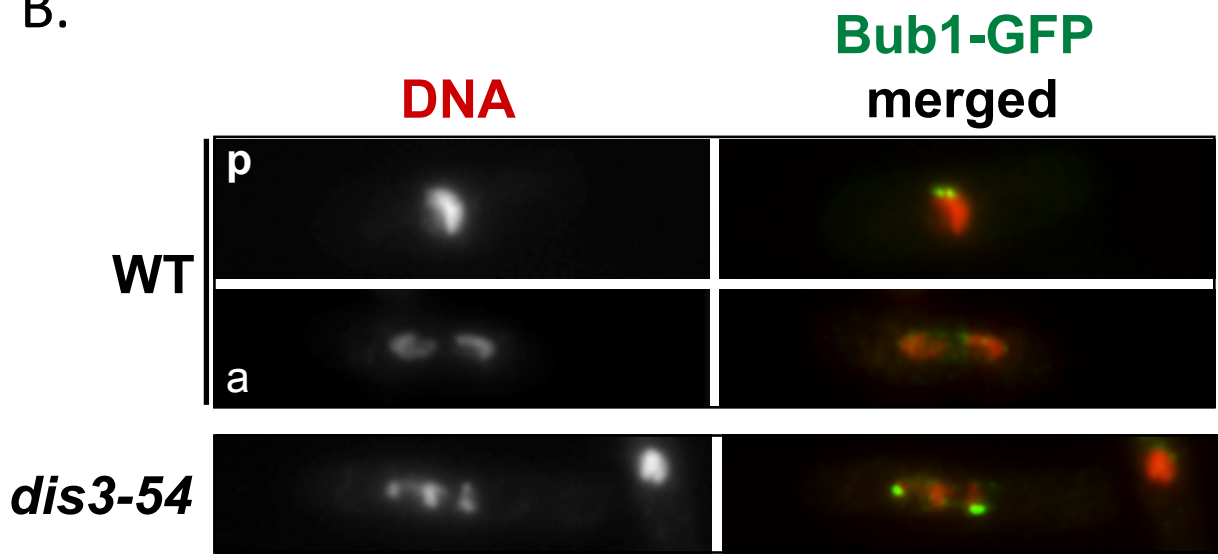


図9. *dis3*変異体におけるスピンドルチェックポイントタンパクMad2、Bub1の局在

A. GFP融合Mad2タンパク質を発現する遺伝子を染色体上に組み込んだ野生株と*dis3*変異体を作製し、20°Cにおいて観察した。DNAはHoechst H333342にて可視化し、非固定下にて観察した。野生株では、前中期(p)の細胞でのみMad2シグナルが観察され後期(a)細胞ではMad2のドット状シグナルは観察されなかった。一方、分裂期の全ての*dis3*変異体において、染色体上にMad2シグナルが観察された(n=23)。

B. 野生株と*dis3*変異体におけるBub1-GFPの局在。20°Cにて培養後メタノール固定にて観察。野生株では前中期(p)の細胞にのみBub1-GFPシグナルが染色体上に観察されたが、*dis3*変異体では分裂期の全ての細胞において強いBub1-GFPシグナルが観察された(n=24)。Scale bar = 10μm。

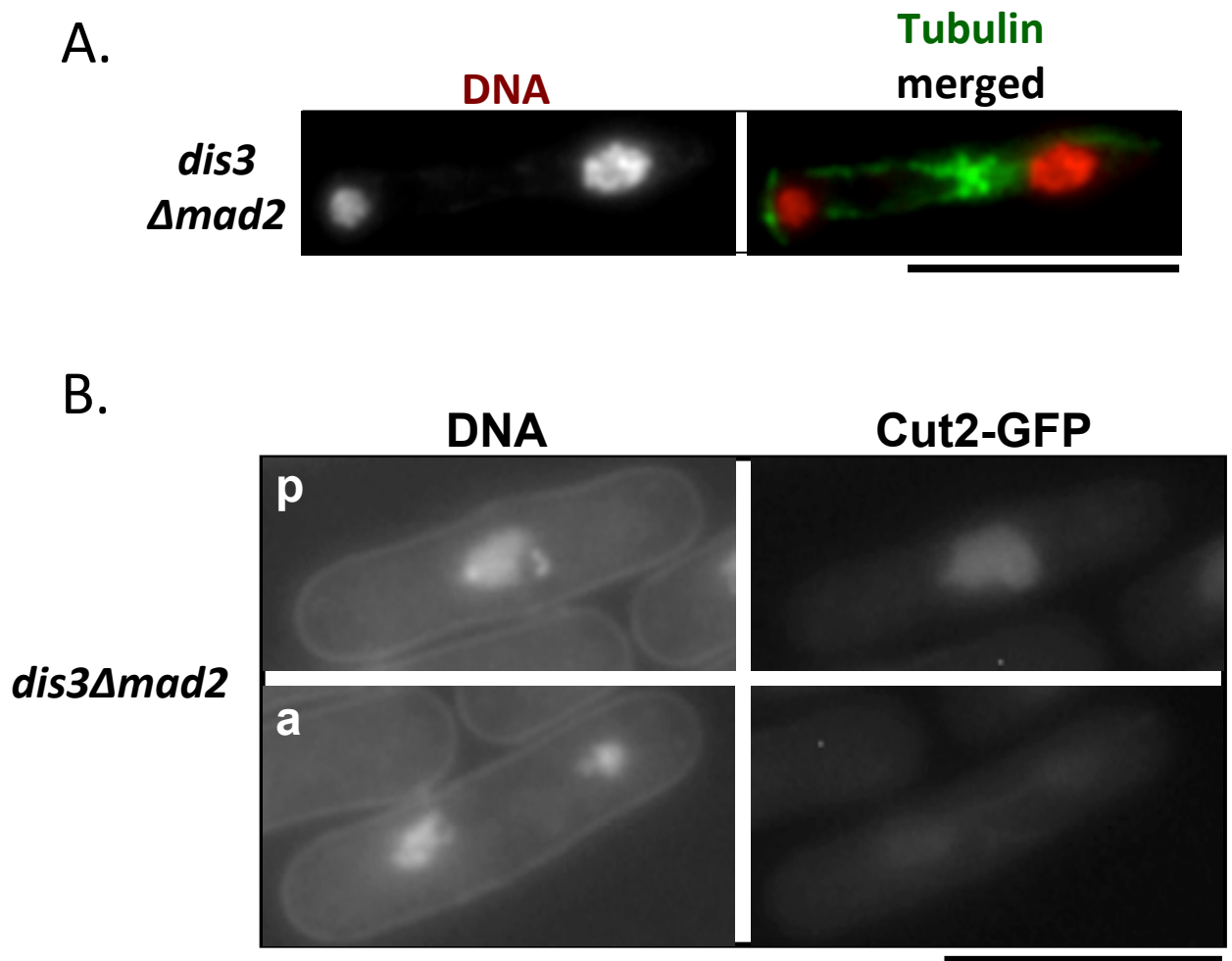
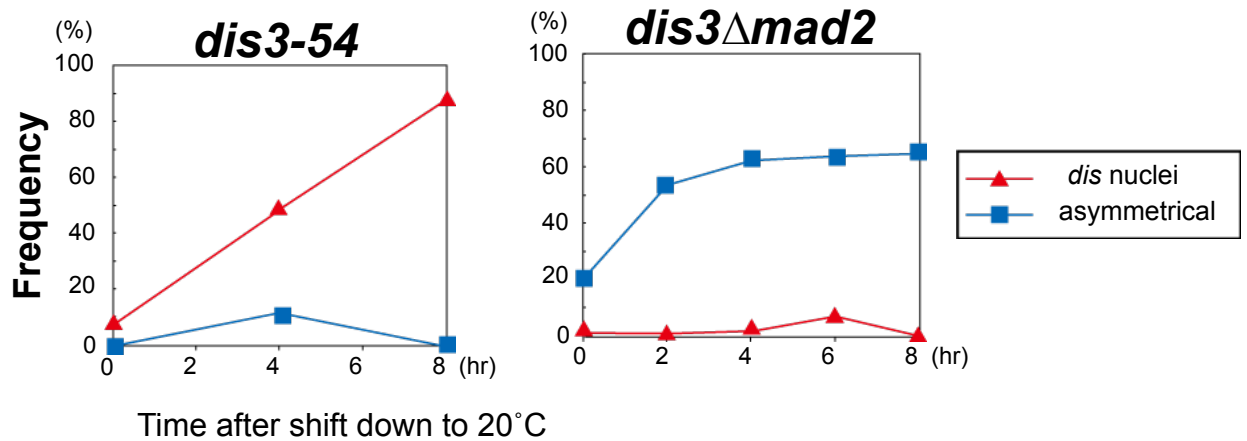


図10. *dis3*変異体はMad2タンパク質依存的に分裂期に停止している

A. *dis3Δmad2*二重変異体では、スピンドルが細胞両端まで伸長し不均等な染色体分配が起こる。培養、染色の方法は図6.A.と同様。

B. *dis3Δmad2*二重変異体におけるCut2-GFPの局在。培養、染色の方法は図8.と同様。細胞内のCut2シグナルの消失が二重変異体が分裂期中期から後期へ以降したことを示している。Scale bar = 10μm。

A.



B.

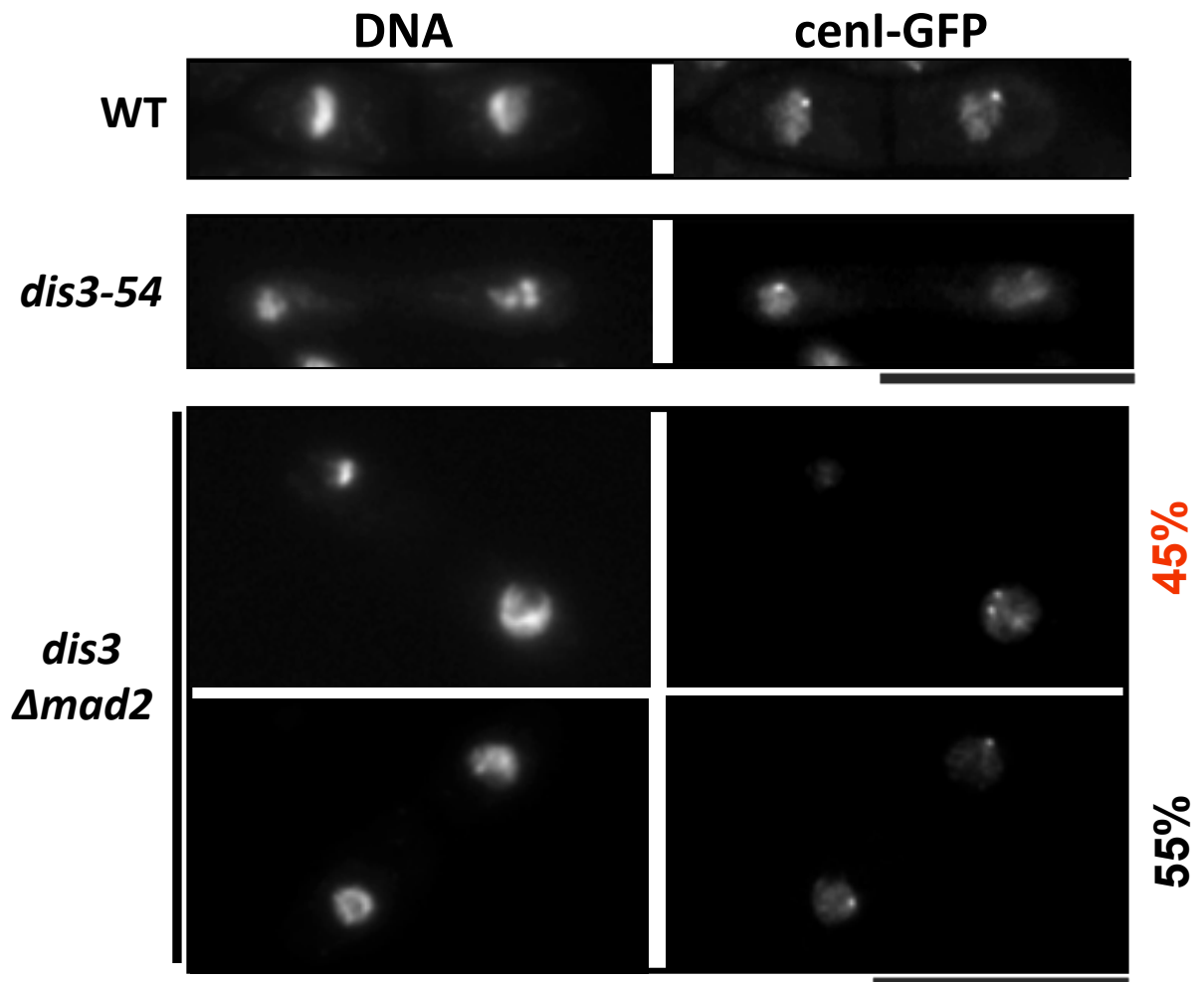


図11. *dis3Δmad2*変異体では染色体不均等分配が起こる。

A. *dis3*変異体(左)、*dis3Δmad2*二重変異体(右)の制限温度シフトダウン後の分裂期表現型の経時変化。赤線:“*dis*”表現型(図4、参照)、青線:非対称な姉妹核、大小核表現型をそれぞれ示している。*dis3*変異体は“*dis*”表現型を、一方、*dis3Δmad2*変異体は大小核表現型を示す。

B. 野生株、*dis3*変異体、*dis3Δmad2*変異体におけるcenI-GFPの分配様式。制限温度下の各細胞をメタノール固定し、DNAはHoechstにて可視化した。野生株では、姉妹核のそれぞれにcenI-GFPのドットシグナルが1点ずつ観察され、*dis3*変異体では、姉妹核のどちらか一方にのみ1-2点のしぐなるが観察される。一方、*dis3Δmad2*二重変異体では、45%の細胞で一方の核にのみ2点、55%の細胞において1点ずつシグナルが観察された。Scale bar = 10μm。

al., 2000)。実際に *dis3Δmad2* 二重変異株において、姉妹染色体の不均等分配が起きているかどうかを確認するために、第 1 番染色体のセントロメア領域を可視化する遺伝子セットを染色体に組み込んだ *dis3* 変異体、*dis3Δmad2* 二重変異株を作製し観察した (図 11. B.)。野生株の細胞ではそれぞれの姉妹核にセントロメアを示す cenI-GFP シグナルが 1 点ずつ観察された。*dis3* 変異体では、過凝縮した 3 対の染色体の 1 つに 1 点もしくは 2 点の cenI-GFP シグナルが観察された。これは *dis3* 変異体では姉妹染色体の分離が起こっていないことを示している。それに対して、*dis3Δmad2* 二重変異株では、姉妹核を有する細胞の約 55%でそれぞれの姉妹核に cenI-GFP シグナルが観察されたが、約 45%の細胞では、一方の姉妹核にのみ 2 点の cenI-GFP シグナルが観察された (図 11. B.)。この結果は、*dis3Δmad2* 変異体では姉妹染色体の不均等分配が起こっていることを示している。

1.5 *dis3* 変異体は TBZ に感受性を示す

微小管機能や動原体機能に欠損を示す多くの変異体が TBZ (Thiabendazole) を代表とする微小管重合阻害剤に感受性を示すことが知られている (Umesono et al., 1983、Beinhauer et al., 1997、Garcia et al., 2001、Toyoda et al., 2002)。*dis3* 変異体や *dis3Δmad2* 二重変異株が TBZ 感受性を示すかどうかを調べた。連続希釈したそれぞれの細胞培養液をさまざまな濃度の TBZ を添加した栄養培地にスポットした (図 12.)。野生株をネガティブコントロールに、 α 1-tubulin 変異体である *nda2* をポジティブコントロールに使用した。準許容温度の 30°C においても *dis3* 変異体、*dis3Δmad2* 二重変異株ともに TBZ に感受性を示した。

ここまでの結果から、*dis3* 変異体では分裂期中期における動原体-動原体紡錘体間の安定な二方向性結合の確立に欠損があり、それによって、Mad2 タンパク質を含むスピンドルチェックポイント機構が活性化され分裂期中期にて細胞周期が停止する、と結論した。

1.6 *dis3* 変異体の変異は中央領域の RNB domain の保存された Proline を Leucine に置換する (*P509L*)

次に、Dis3 タンパク質の分裂期における機能をさらに理解するために、*dis3* 変異体の変異部位を同定した。野生株と *dis3* 変異体のそれぞれから *dis3*+遺伝子領域の DNA 配列を PCR 法により増幅し、その塩基配列を比較した (図 13.)。1 カ所の変異部位が見つかった (*C1690T*)。この塩基置換により、アミノ酸配列の 509 番目のプロリンがロイシンに置換される (*P509L*) (図 13.)。509 番目のプロリンは Dis3 タンパク質の中央領域に存在する RNB

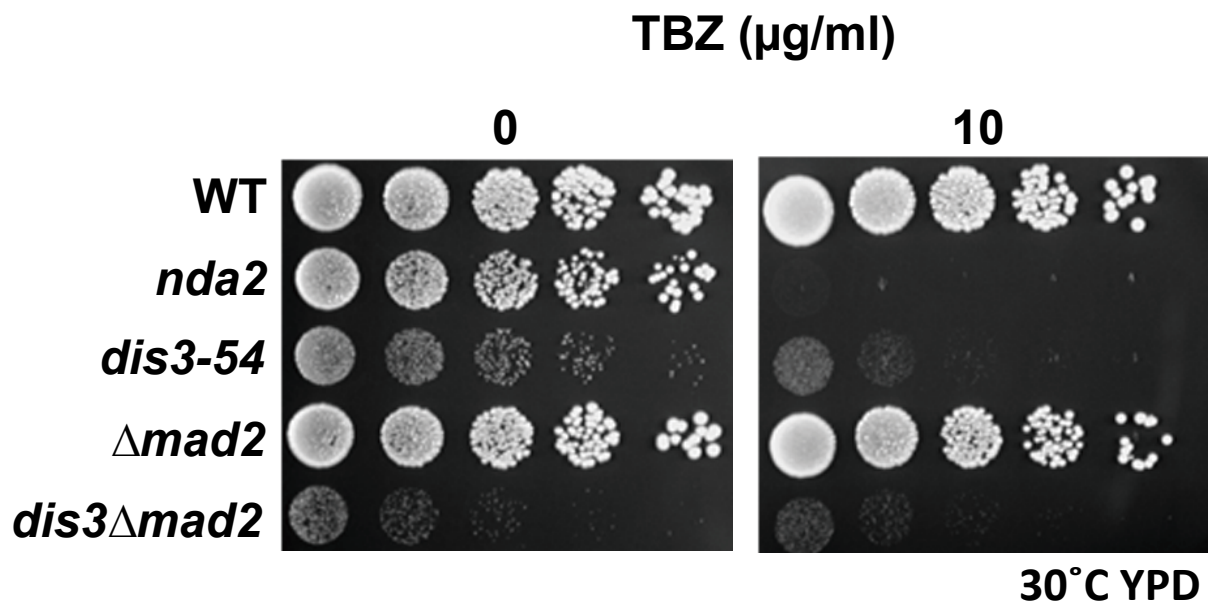


図12. *dis3*、*dis3* $\Delta mad2$ 変異体はTBZに超感受性を示す

TBZを0、10 μg/ml含むYPD固形培地を用意し、野生株、*nda2*、*dis3*、 $\Delta mad2$ 、*dis3* $\Delta mad2$ 変異体それぞれを連続希釈(1:5)してスポットし、30°C(準許容温度)下にて培養した。TBZ感受性について、野生株をポジティブコントロールに、 α 1-tubulin変異体である*nda2*をネガティブコントロールに使用した。準許容温度の30°Cにおいても*dis3*変異体、*dis3* $\Delta mad2$ 二重変異株ともにTBZに感受性を示した。

S.pombe Dis3

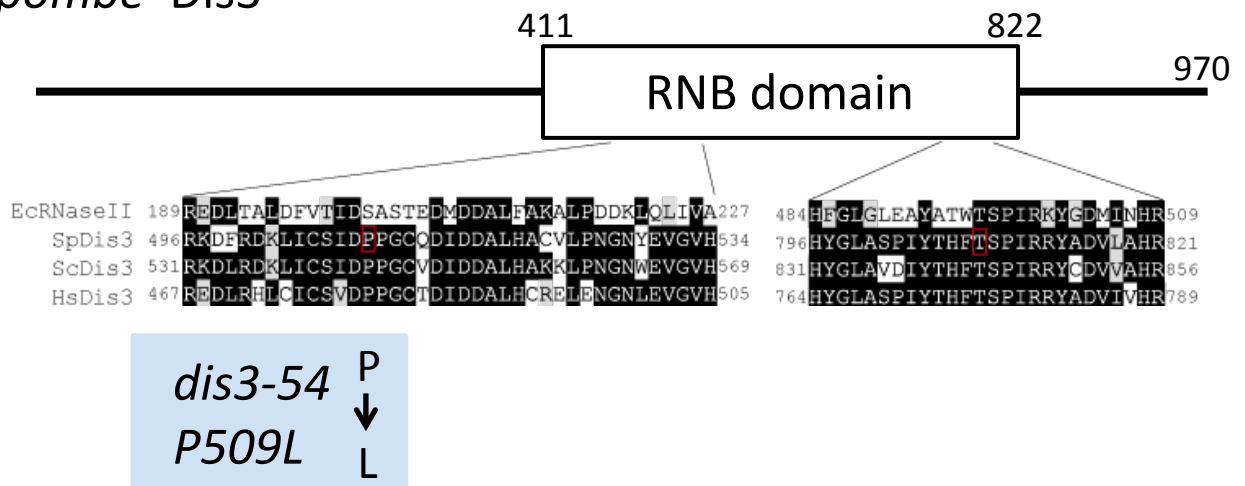


図13. *dis3-54*変異体のDNA変異はRNBドメイン中のプロリンをロイシンに置換する

Dis3タンパク質はPINc、RNB、そしてS1ドメインを有する。PINcはexonuclease活性もしくはヌクレオチド結合活性に関連したドメインであり、S1はRNA結合ドメインとして知られている。RNBドメインはRNaseIIファミリータンパク質に高度に保存されたexonuclease活性ドメインである。RNBドメイン中のMotif I と IV の大腸菌(Ec)RNaseII、分裂酵母(Sp)Dis3、出芽酵母(Sc)Dis3、ヒト(Hs)Dis3のそれぞれのアミノ酸配列を示している。同一アミノ酸を黒box白文字、相同アミノ酸を灰色box黒文字で示す。*dis3-54*の変異部位は509番目のプロリンをロイシンに置換する。

ドメイン内に存在する。RNB ドメインは exoribonuclease 活性を示す RNaseII ファミリーで保存されたドメインであり、その中で P509 は真核生物の中では非常に高度に保存されているアミノ酸であることが分かった。

1.6 分裂酵母から精製した Dis3 タンパク質は *in vitro* にて RNA 分解活性を示す

分裂酵母 Dis3 タンパク質は、C 末端に RNaseII ファミリータンパク質に特徴的な RNB ドメインを有する。実際に Dis3 タンパク質が RNA 分解活性を持つ酵素であるかどうかを調べた。

C 末端に GST を融合した野生型、変異型 (P509L) Dis3 タンパク質を *nmt1* promoter により大量に発現誘導できるプラスミドを作成した。RNase 活性のないネガティブコントロールとしては、RNB ドメイン中の進化的に良く保存されたチロシン残基 (T808) をアラニンに置換した変異 Dis3 タンパク質 (T808A) を発現するプラスミドを作成した。それぞれのプラスミドを野生株、*dis3* 変異体に形質転換し 33°C、20°C にて培養した (図 14.)。野生型 GST-Dis3 は *dis3* 変異体の低温感受性を相補出来るのに対して、*dis3* 変異型、T808A 変異型 GST-Dis3 は相補することが出来なかった。

次に、それぞれの株を液体培地にて培養し、発現誘導を起こした後に細胞を回収し、細胞抽出液からタンパク質を精製した。精製したタンパク質を用いて 37°C と 20°C において *in vitro* RNase assay を行った。基質として、分裂酵母細胞抽出液から精製した ribosomal RNA (rRNA) を用い、反応液中にて精製タンパク質と混合した後、時間経過に従い反応を停止させアガロースゲルにて電気泳動した。その後、蛍光色素を用いて基質とした rRNA を染色、蛍光強度を測定し、反応曲線を作成した (図 15. A, B.)。

GST タンパク質のみでは、37°C、20°C とともに反応時間内で rRNA は安定に存在した。それに対して、野生型 Dis3-GST タンパク質を反応液に混ぜると、ribosomal RNA は時間依存的に分解された。温度により分解速度は異なっており、37°C ではほぼ全ての rRNA が反応開始後 20 分で分解されたが、20°C では反応開始 120 分後においても 20% 近くの rRNA が分解されず残った。この結果より、精製した分裂酵母 Dis3 タンパク質は RNA 分解活性を有する事が示唆された。

次に変異型 Dis3 タンパク質の *in vitro* RNA 分解活性を測定した (図 15. A, B.)。37°C にて基質 rRNA が 50% 分解されるのに必要な時間は、野生型-Dis3、P509L-Dis3、T808A-Dis3 それぞれで、 ≤ 5 分、約 10 分、約 10 分であった。また、20°C ではより顕著な差が観察され、同様に 50% の基質を分解するのに必要な時間は、野生型-Dis3、P509L-Dis3、T808A-Dis3 それぞれで、 ≤ 30 分、約 120 分、 ≥ 240 分であった。以上の結果は P509L-Dis3 変異タンパ

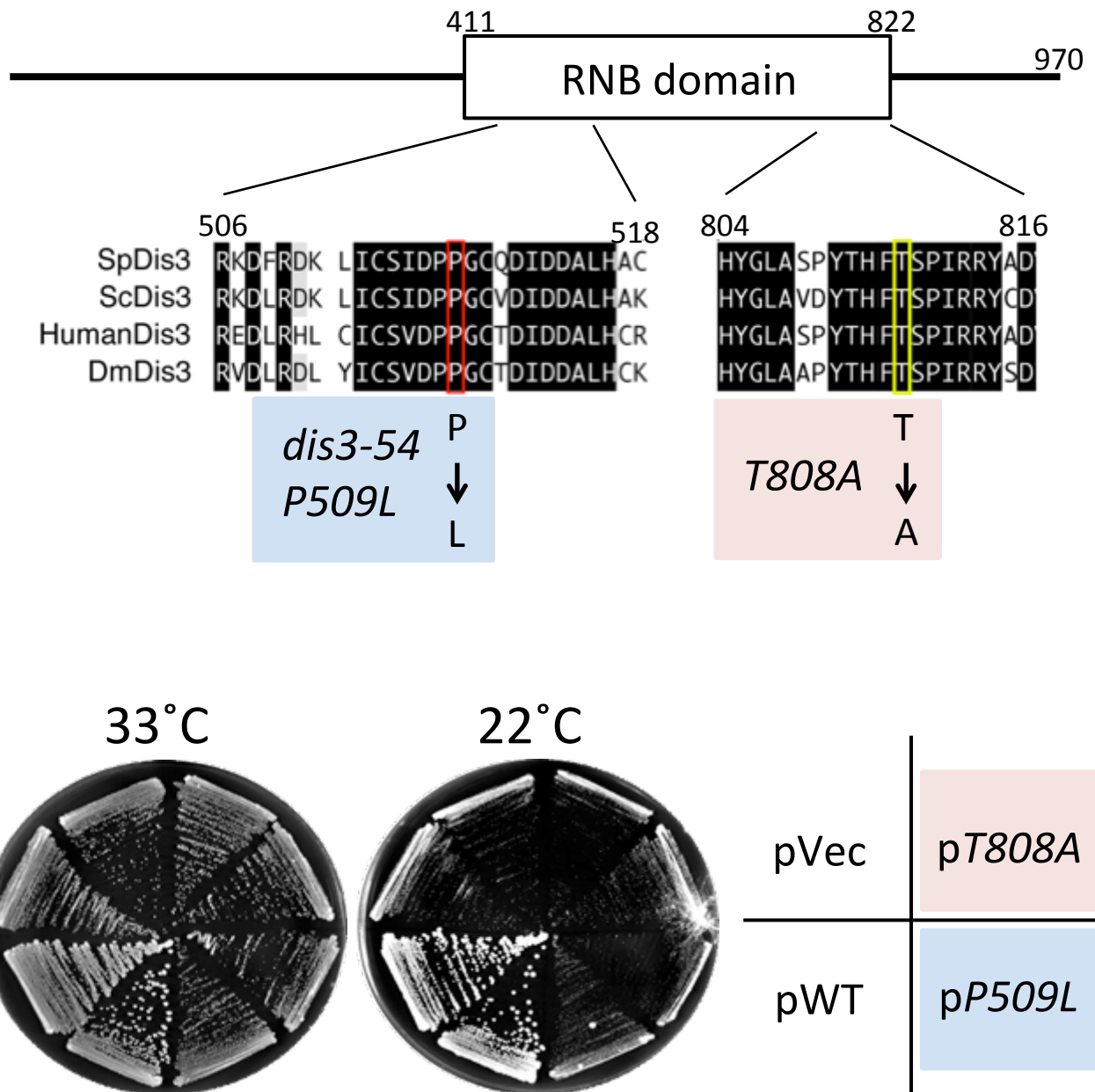
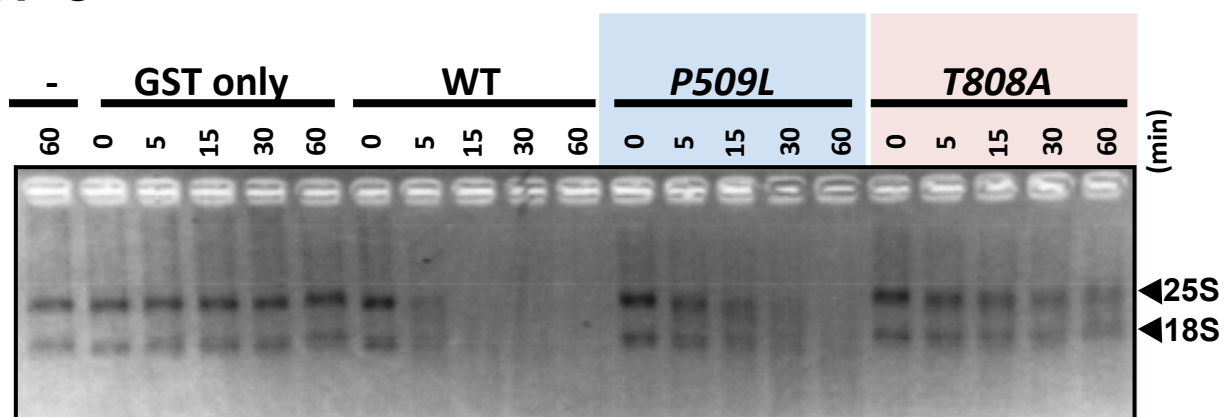


図14. *P509L*、*T808A*-Dis3 plasmidは *dis3*変異体の低温感受性を相補できない。

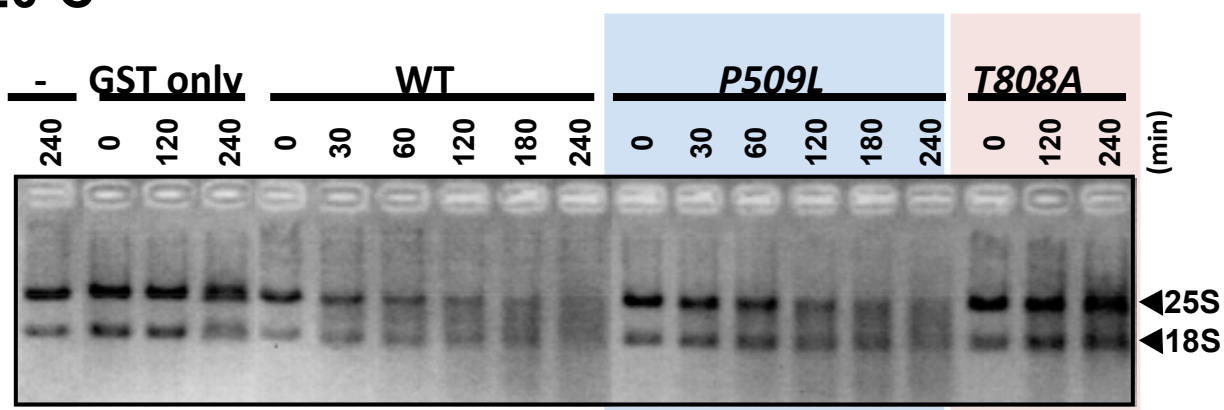
WT、*P509L*、*T808A*-Dis3タンパク質それぞれを発現するmulticopy plasmidを作成し、*dis3*変異体に形質転換した。33°Cと20°CにおいてEMM2最少栄養固形培地にて培養した。RNBドメインに変異をもつ*P509L*、*T808A* plasmidはともに*dis3*変異体の低温感受性を相補できなかった。

A.

37°C



20°C



B.

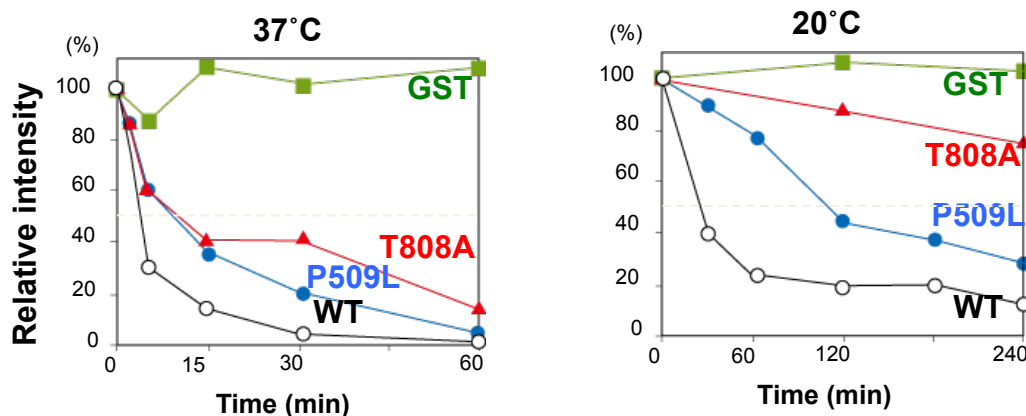


図15. *dis3*変異タンパク質は制限温度下においてRNA分解活性が低下している

A. WT、P509L、T808A変異Dis3タンパク質の37°C(上)と20°C(下)における*in vitro* RNase分解活性。各タンパク質(1pmol/pane)と基質として使用したRNA(1mg/lane)は分裂酵母から精製している(材料と方法、参照)。各反応時間において反応を終了し、基質RNAを変性アガロースゲルにて電気泳動後、Ethidium bromideにより染色した。矢頭は、25S、18S rRNAを示す。

B. 37°C、20°C、それぞれの温度で3回ずつ独立に施行した反応の定量結果。Image analyzerを用いて、25S、18S rRNAのbandのシグナル強度を測定し、各反応の0分におけるシグナル強度を100%とした標準化を行った。

ク質は野生型-Dis3 に比較して、特に低温下にて RNA 分解活性が低い可能性を示している。

以上の結果から、分裂酵母の Dis3 タンパク質は RNA 分解活性を有すること、そしてその活性は、*dis3* 変異体の *P509L* 変異により低下することが示唆された。

1.7 *dis3* 変異体ではセントロメア領域の silencing が欠損している

これまでの報告から、分裂酵母のセントロメア DNA が転写されること、そして、転写産物である siRNAs とその下流で機能する RNAi 経路によりヘテロクロマチン化され遺伝子の転写が抑制される (silencing) ことが明らかになっている (総説として、Grewal SI., 2010)。分裂酵母 Dis3 がこれらのメカニズムに関わっている可能性について調べた。

まず、Dis3 がセントロメアの silencing に関係しているかどうかを調べるため、セントロメアの各領域 (*cnt1*、*imr1*、*otr*) に *ura4*+reporter 遺伝子を組み込んだ *dis3* 変異体を作成した。培養後、無添加の培地と FOA を加えた培地とに各細胞をスポットし、コロニー形成能を調べた (図 16.)。FOA は *ura4* を発現する株にとってのみ毒性を示す薬剤である。*cnt1*、*dgl* 領域の silencing 欠損を示すポジティブコントロールとして *mis6*、 Δ *dcr1* 変異体をそれぞれ使用した。野生株では、各セントロメア領域で正常な silencing が観察されるが、*mis6* 変異体では *cnt1* 領域が、 Δ *dcr1* 破壊株では *otr* 領域において silencing 欠損が観察された。一方、*dis3* 変異体では、調べた全てのセントロメア領域において silencing が欠損することが分かった。セントロメア領域では *cnt1* における silencing 欠損が最も強く、*imr1*、*dgl* 領域は同程度の欠損であった。また、セントロメア領域以外でも染色体腕部で silencing が起こることが知られている mating type locus (*mat*) でも同様に silencing の欠損が起こっていた。以上の結果から、*dis3* 変異体では、セントロメア、*mat* 領域など染色体のさまざまな領域で silencing に欠損を示すことが分かった。

1.8 *dis3* 変異体では Swi6 の *otr* 領域への結合が減少している

Swi6 タンパク質はヒトの HP1 (Heterochromatin Protein 1) の分裂酵母のホモログであり、クロモドメインを介してヘテロクロマチンにおけるヒストン H3 のメチル化された K9 残基と相互作用し、その形成や維持に関わっていることが明らかになっている (Grewal SI., 2010)。*dis3* 変異体において、*otr* 領域の silencing が欠損していることから、Swi6 の *otr* への結合が正常であるか否かを調べた。Swi6 抗体を用いた Chromatin 免疫沈降法 (ChIP 法) を行った (図 17.)。野生株では Swi6 タンパク質は *otr* 領域の DNA に強く結合しているが、RNAi 変異体や Δ *swi6* 破壊株ではその結合が検出されなかった。一方、*dis3* 変異体で

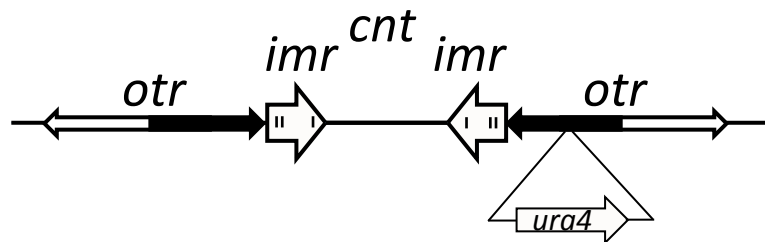
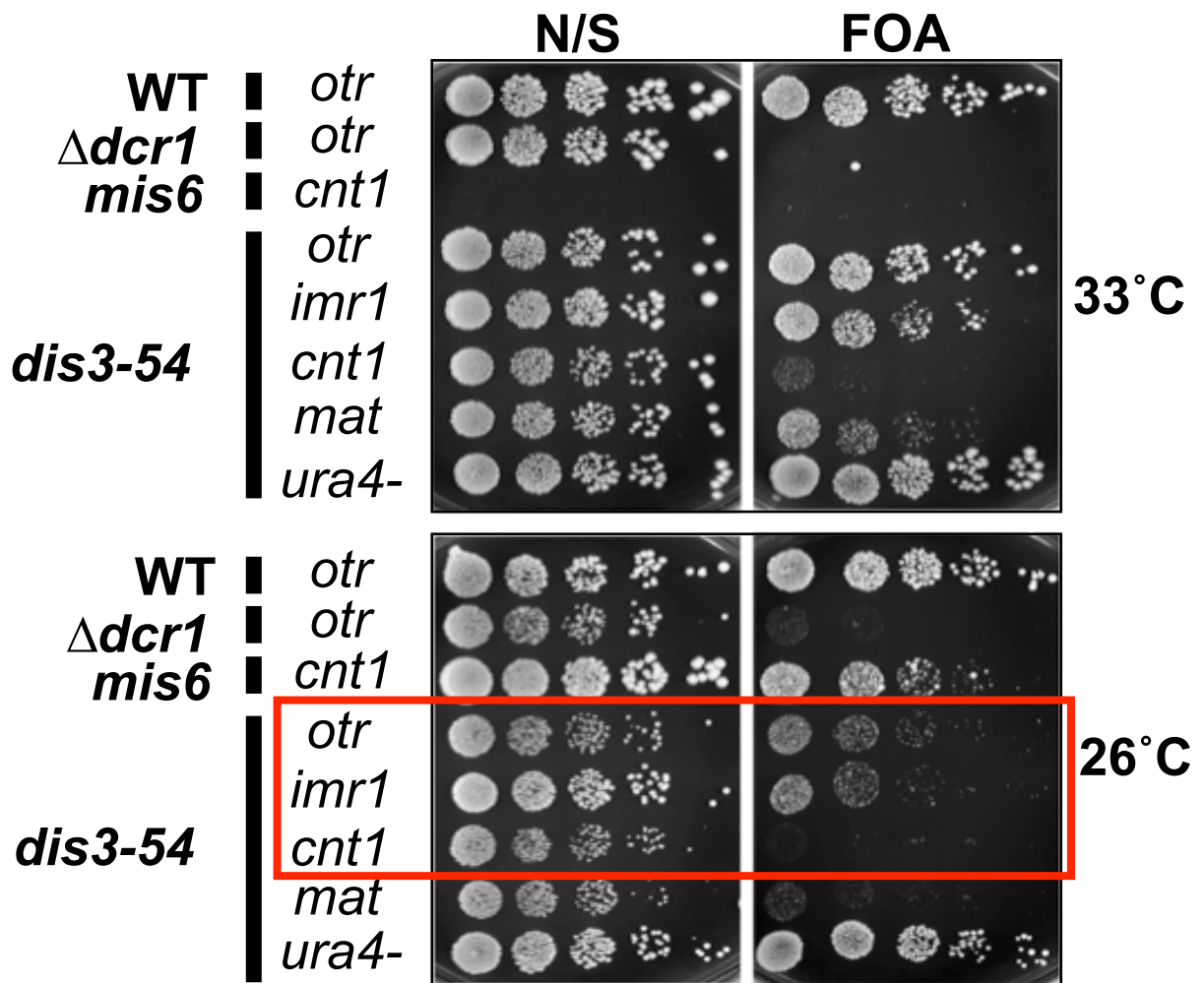


図16. *dis3*変異体はセントロメア領域の silencing に欠損を示す

セントロメアの各領域(*cnt1*, *imr1*, *otr*)にレポーター遺伝子として $ura4+$ を組み込んだ野生株、*dis3*変異体、*mis6*変異体、 $\Delta dcr1$ 破壊株を作成した。 $ura4+$ 遺伝子の挿入された分裂酵母セントロメアの模式図を下に示した。*dis3*変異体については、レポーター遺伝子を持たない株(*ura4-*)、mating type locus (*mat1*)にレポーター遺伝子を組み込んだ株(*mat*)も同時に実験した。各株を非選択のYPD培地と5-FOA(Ura4タンパク質を発現する株の育成を阻害する薬剤)を含むYPD培地に1/5連続希釈にてスポットし、33°Cと26°Cにて培養した。*mis6*変異体は高温感受性であり、33°Cと26°Cがそれぞれ制限温度、許容温度である。

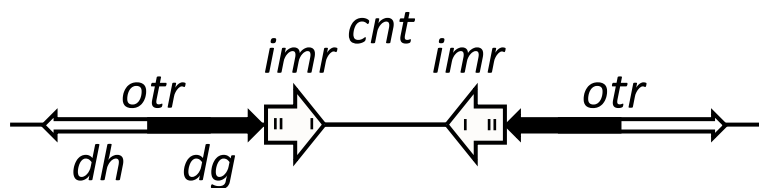
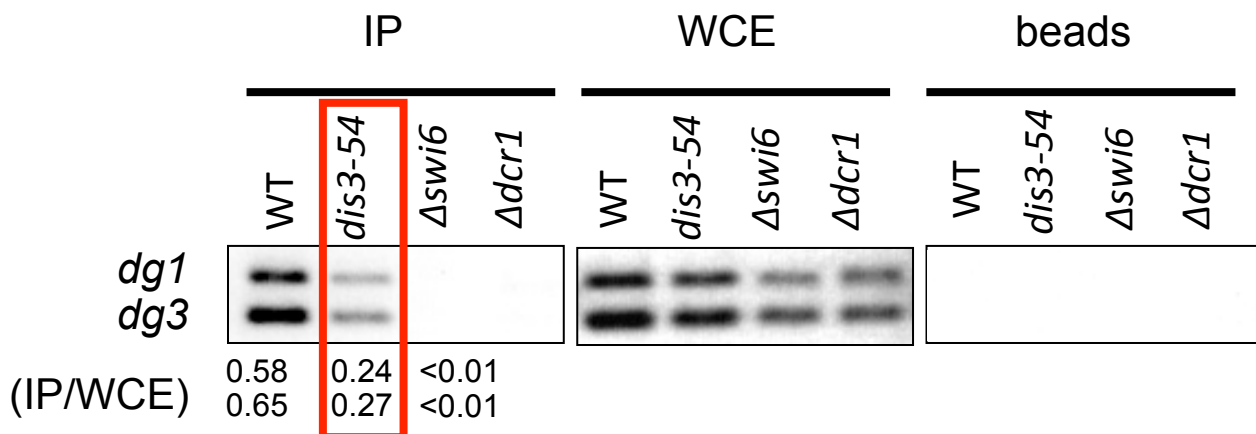


図17. *dis3*変異体ではSwi6の*otr* への相互作用が減少している。

抗Swi6抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。ChIPにて共沈したDNAを*dg1*、*dg3*に特異的なプライマーを用いてPCRで増幅した。positive controlとして野生株を、negative controlとして $\Delta swi6$ 、 $\Delta dcr1$ 株を用いた。野生株ではSwi6タンパク質と*dg*領域との相互作用が検出されるが、*swi6*、*dcr1*破壊株では相互作用が検出されない。*dis3*変異体では、野生株と比較してSwi6と*dg*領域との相互作用が減少していた。

は、Swi6 は *otr* 領域との相互作用が非常に弱まっていることが分かった。Swi6 タンパク質の量はどの株でも大きな差は認めなかった。Dis3 は Swi6 の *otr* への結合に必要であることが分かった。

1.9 *dis3* 変異体ではセントロメア *otr* 由来の転写産物が蓄積している

これまでの報告では、*Δdcr 1*、*Δrpd1* などの RNAi 変異体では細胞内に *otr* 領域から転写された RNA が蓄積していることが分かっている (Grewal SI., 2010)。RT-PCR 法を用いて、*dis3* 細胞内でも *otr* 由来の転写産物が蓄積しているかどうかを調べた (図 18.)。セントロメア *otr* の一部である *dh* 配列由来の転写産物 RNA (400nt) を forward、reverse 両方向で検出できる primer を設計し RT-PCR を行った。野生株では 30°C、20°C とともに reverse、forward 両方向とも転写産物はほとんど検出されなかった (33°C の reverse 方向のみ弱いながら転写が観察された)。それに対し、*dis3* 変異体では 20°C において forward、reverse とともに野生株と比較して転写産物が蓄積していることが分かった。しかし、ポジティブコントロールとして使用した RNAi 変異体において観察される転写産物の蓄積に比べるとその量は少ないことが分かった。

1.10 *dis3* 変異体ではセントロメア *otr* 由来の siRNAs の形成やそれらの RITS 複合体への取り込みは正常である

分裂酵母のセントロメア *otr* 領域のヘテロクロマチン形成には、*otr* 領域からの転写 RNA が Dcr1 により分解され、22-26 ヌクレオチドの siRNA が形成されることが必須であることが示されている (Grewal SI., 2010)。siRNA は RITS 複合体と呼ばれる複合体に取り込まれた後、DNA 配列特異的な silencing に機能すると考えられている (図 4.)。Dis3 が Dcr1 による siRNA 形成に関わっている可能性を検討するため、*dis3* 変異体の中でこれら siRNA の形成が正常に起きているかどうかを Northern blot 法により調べた。細胞抽出液から RNA を精製し、probe として *dh* 領域の siRNA に特異的なものを用いた。これまでの報告の通り、野生株では 20-30nt の長さの *dh* 領域由来の siRNA が検出されたが、*Δdcr 1* 株では検出されなかった (図 19.)。そして、制限温度下の *dis3* 変異体では野生型と変わらない正常な siRNA が形成されていることが分かった。Dis3 は siRNA の形成自体には必要ではないと結論した。

次に、RITS 複合体の構成因子の一つである Chp1 を免疫沈降し共沈する複合体中に siRNA が存在するかどうかを Northern blot により調べた (図 20.)。野生株と同様に *dis3* 変異体においても Chp1 と共沈する複合体の中に siRNA が検出されることが分かった。この結果

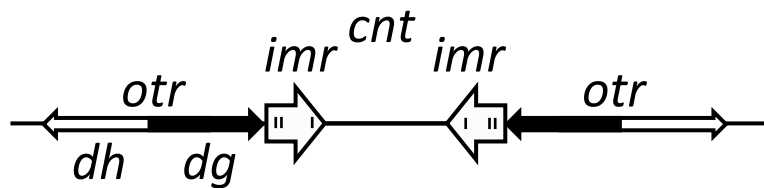
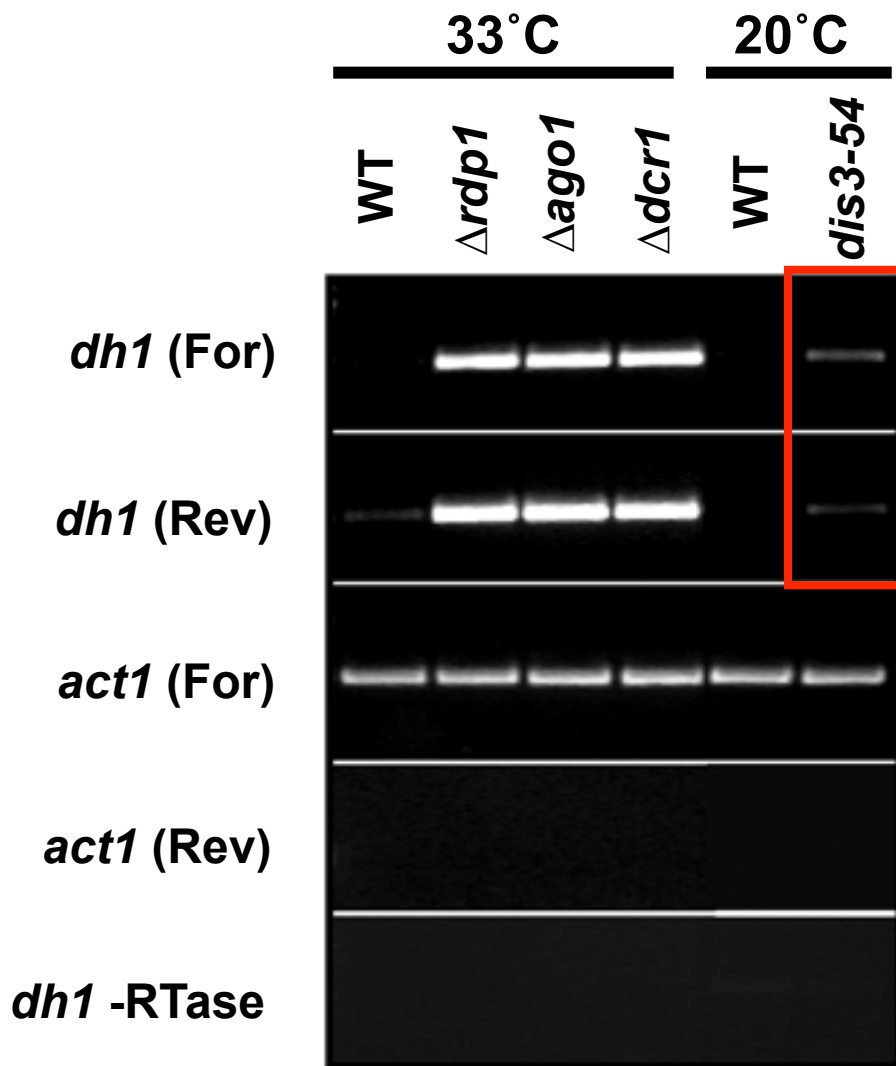


図18. *dis3*変異体では*otr*領域由来の転写産物が蓄積している。

野生株、*dis3*変異体と、 $\Delta rdp1$ 、 $\Delta ago1$ 、 $\Delta dcr1$ の各RNAi変異体を20°C、33°Cにてそれぞれ培養し、細胞からRNAを回収した。回収したRNAを用いて示した各primerによる定量的RT-PCRを行った。各RNAi変異体では、*dh*領域のDNAのforward、reverse両方向の転写産物が検出される。野生株では少量のreverse方向の転写産物のみが検出される。一方、*dis3*変異体では、forward、reverseともに野生株に比較して転写産物の蓄積を認める。controlのactin遺伝子(*act1*)では、全ての株でforward方向の転写産物のみ検出される。また、逆転写酵素を用いずに行ったcontrol(-RTase)では、全ての株でDNAの増幅を認めない。

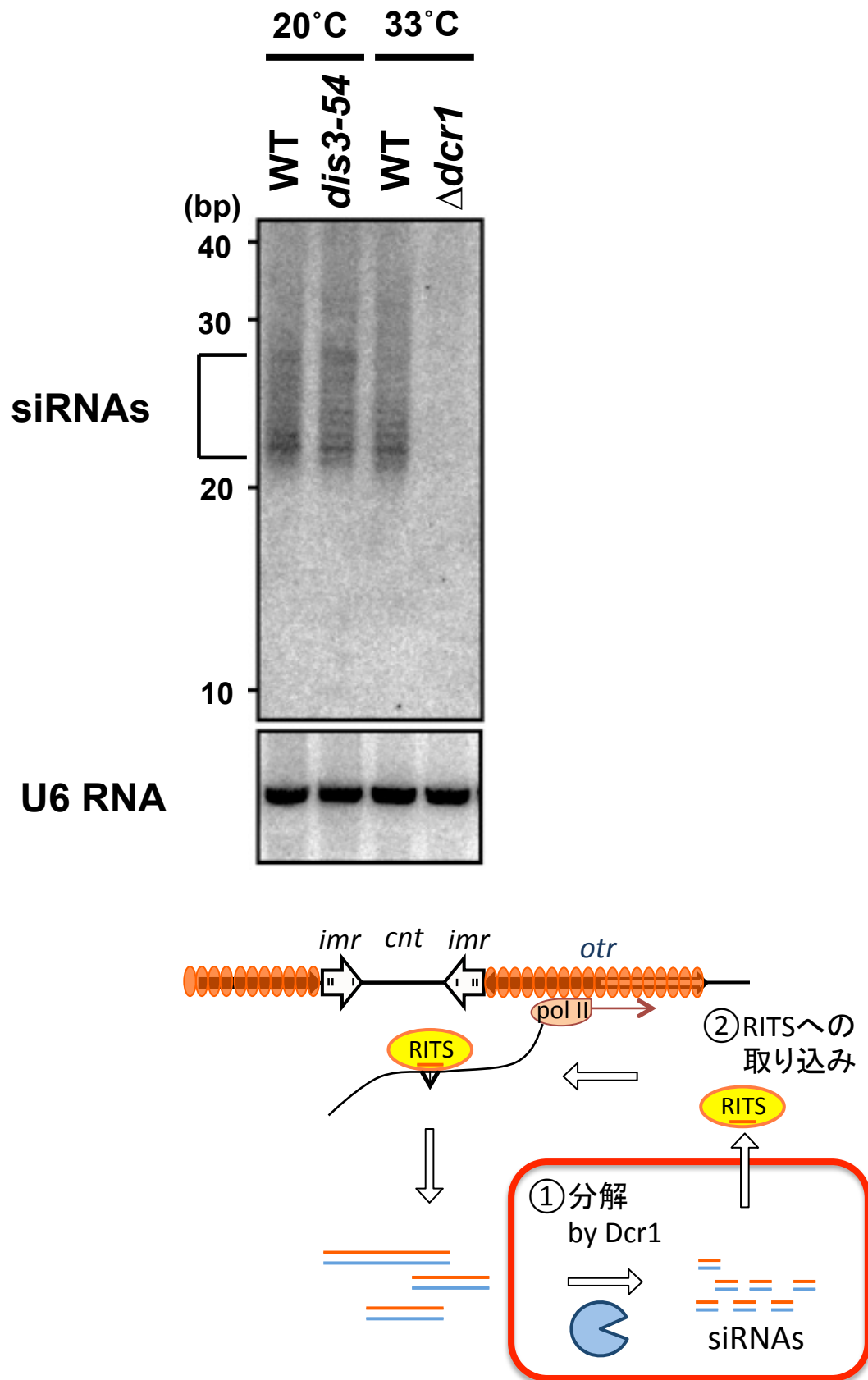


図19. Dis3はcentromere siRNAsの形成には必要ない。

制限温度下(20°C)で培養した野生株と*dis3*変異体から低分子RNAを抽出した。コントロールとして、33°Cにて培養した野生株と $\Delta dcr1$ 変異体を用いた。*dh* repeat由来のsiRNAを特異的に検出するprobeを用いて低分子量Northern blottingを施行した。制限温度下の*dis3*変異体では、野生株と同様にsiRNAsが検出された。*dh* siRNAに対するNorthern blot後、十分に洗浄後同じメンブレンにてU6-snRNAIに対して低分子量Northern blotを行った(下)。

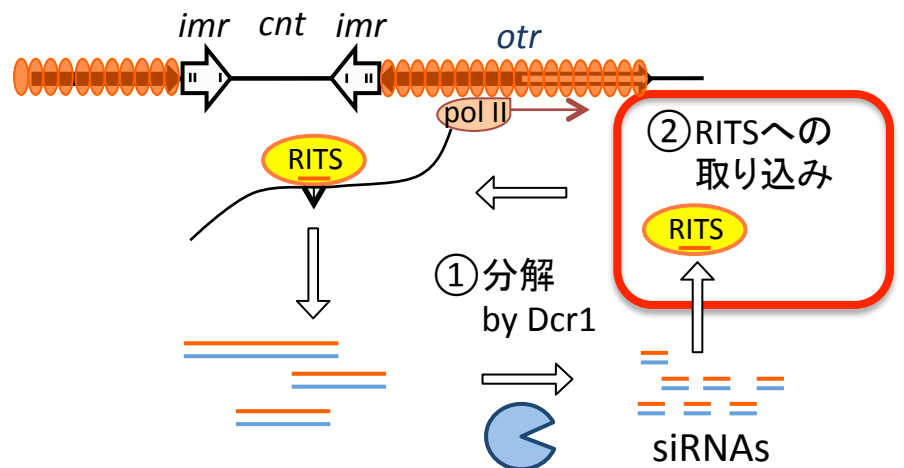
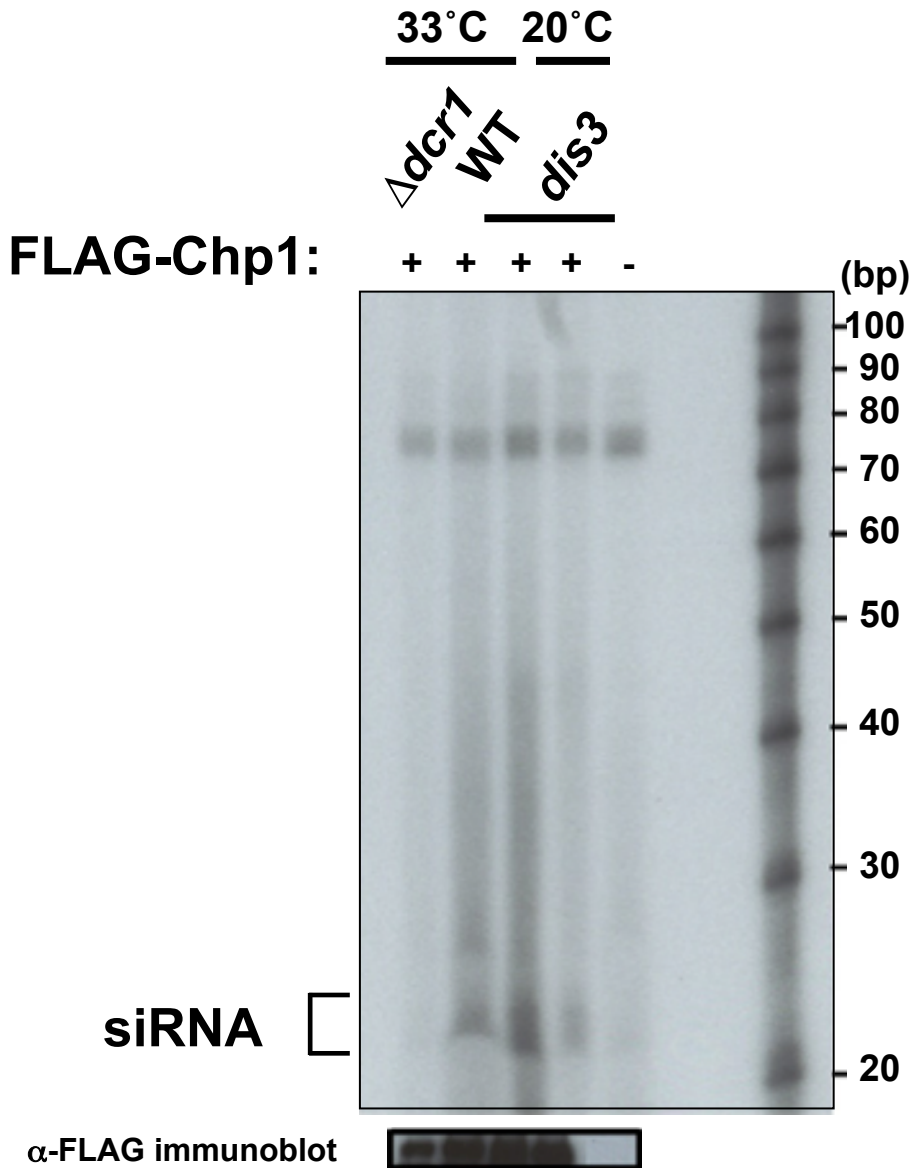


図20. *dis3*変異体ではRITS複合体へのsiRNAの取り込みは正常である

FLAGタグ融合Chp1タンパク質を発現する遺伝子をゲノム上に組み込んだ野生株、*dis3*変異体、 $\Delta dcr1$ 変異体を作成し、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降を試行した。共沈した複合体からphenol-chloroformを用いてRNAを分離し、RNA ligaseを用いて[5'- 32 P]pCpラベルを行った。標識後のRNAを変性ポリアクリルアミドゲルにて分離した。siRNAのpositionを左に示している。*dis3*変異体では、正常な大きさのsiRNAがRITS複合体に取り込まれていた。

から、Dis3 タンパク質は RITS 複合体と siRNA との相互作用には必要でないと結論した。

1.11 *dis3* 変異体ではセントロメア中央領域特異的なクロマチン高次構造は正常に形成されている

dis3 変異体において、*otr* 領域だけではなく、セントロメア中央領域の silencing が欠損していることを示した (図 16.)。これまでに中央領域の silencing に欠損を示すことが示されている *mis6*、*mis12*、*sim4* などの変異体は、中央領域特異的なクロマチン高次構造の構築に欠損を示すことが示されている (Saitoh., 1997, Goshima et al., 1999, Pidoux et al., 2003)。 *dis3* 変異体においても、それらの変異体と同様に、中央領域のクロマチン高次構造に欠損があるかどうかを調べた。ポジティブコントロールとして、*mis12* 変異体を使用した。野生株と *dis3* 変異体は 20°C シフトダウン 8 時間後、*mis12* 変異体は 36°C シフトアップ後 8 時間後にそれぞれ細胞を回収し、核クロマチン分画を調整した。クロマチン分画を MNase にて、0, 1, 2, 4, 8 分間処理した後、各セントロメア領域特異的な probe を用いてサザンブロット法を施行した (図 21.)。セントロメア中央領域は他の染色体領域が規則的なラダーパターンを示すのとは異なり、特異的なスメアパターンを示すことが分かっている (Saitoh., 1997)。 *mis12* 変異体ではこれまでの報告通り、中央領域のスメアパターンが欠損していたが、*dis3* 変異体では野生株同様に正常なラダーパターンを示した。 *dis3* 変異体で認める中央領域の silencing 欠損は、他のセントロメアタンパクの欠損で生じる silencing 欠損と異なったメカニズムで起きていることが予想された。 *dis3* 変異体ではセントロメア中央領域の高次構造自体は正常に維持されていると結論した。

1.12 *dis3* 変異体は $\Delta swi6$ 、 $\Delta dcr1$ 変異体と合成致死を示す

dis3 変異体がセントロメア *otr* 領域の silencing に欠損を示すことから、同様に *otr* 領域の silencing に欠損を示す $\Delta swi6$ や $\Delta dcr1$ などの変異体と遺伝的相互作用を示すかどうかを調べた (図 22.)。 *dis3 $\Delta swi6$ や *dis3 $\Delta dcr1$ 二重変異株は、それぞれ 30°C、33°C にて合成致死を示した。各単独変異体はそれぞれの温度下で正常に生育した。これらの結果は Dis3 タンパク質が *otr* 領域のヘテロクロマチン形成や分裂期のヘテロクロマチン機能において、Swi6 や Dcr1 タンパク質と必須の機能を共有していることを示唆している。**

1.13 Dis3 タンパク質は細胞周期を通じて核内、特に核小体領域に多く局在し

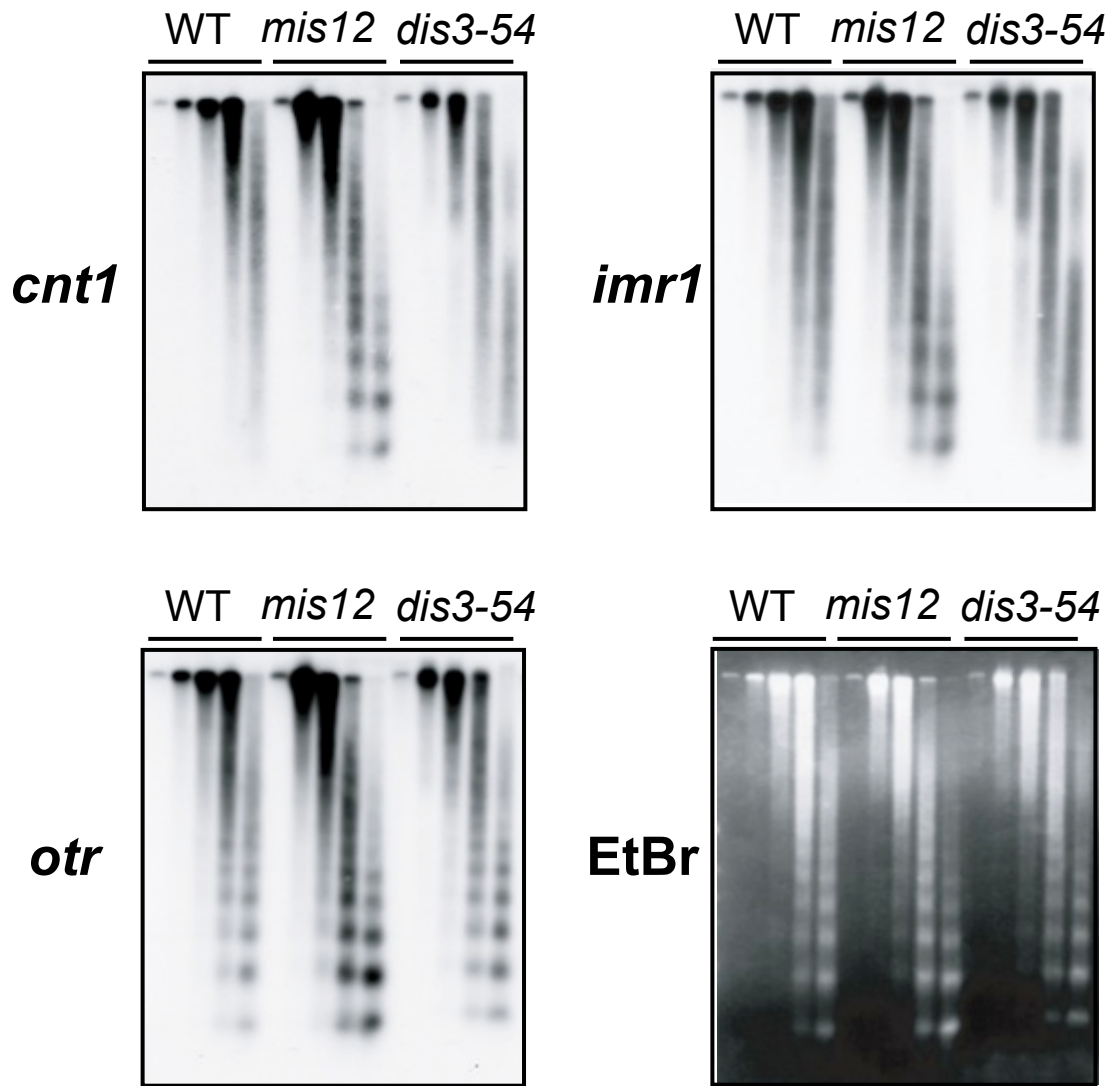


図21. *dis3*変異体ではセントロメア中央領域特異的なクロマチン高次構造は正常である

野生株、*dis3*変異体、*mis12*変異体におけるセントロメア (*cnt1*, *imr1*, *otr*) 領域のクロマチン構造。野生株と*dis3*変異体は20°Cシフトダウン8時間後、*mis12*変異体は36°Cシフトアップ後8時間顔にそれぞれ細胞を回収し、核クロマチン分画を調整した。クロマチンサンプルをMNaseにて、0, 1, 2, 4, 8分間処理した後、各セントロメア領域特異的なprobeを用いてサザンブロットを施行した。中央領域特異的なスミアパターンが*mis12*変異体では欠損しているが、*dis3*変異体では野生株同様であった。*otr*領域のクロマチンパターンも野生株と比較して明らかな異常は認めなかった。

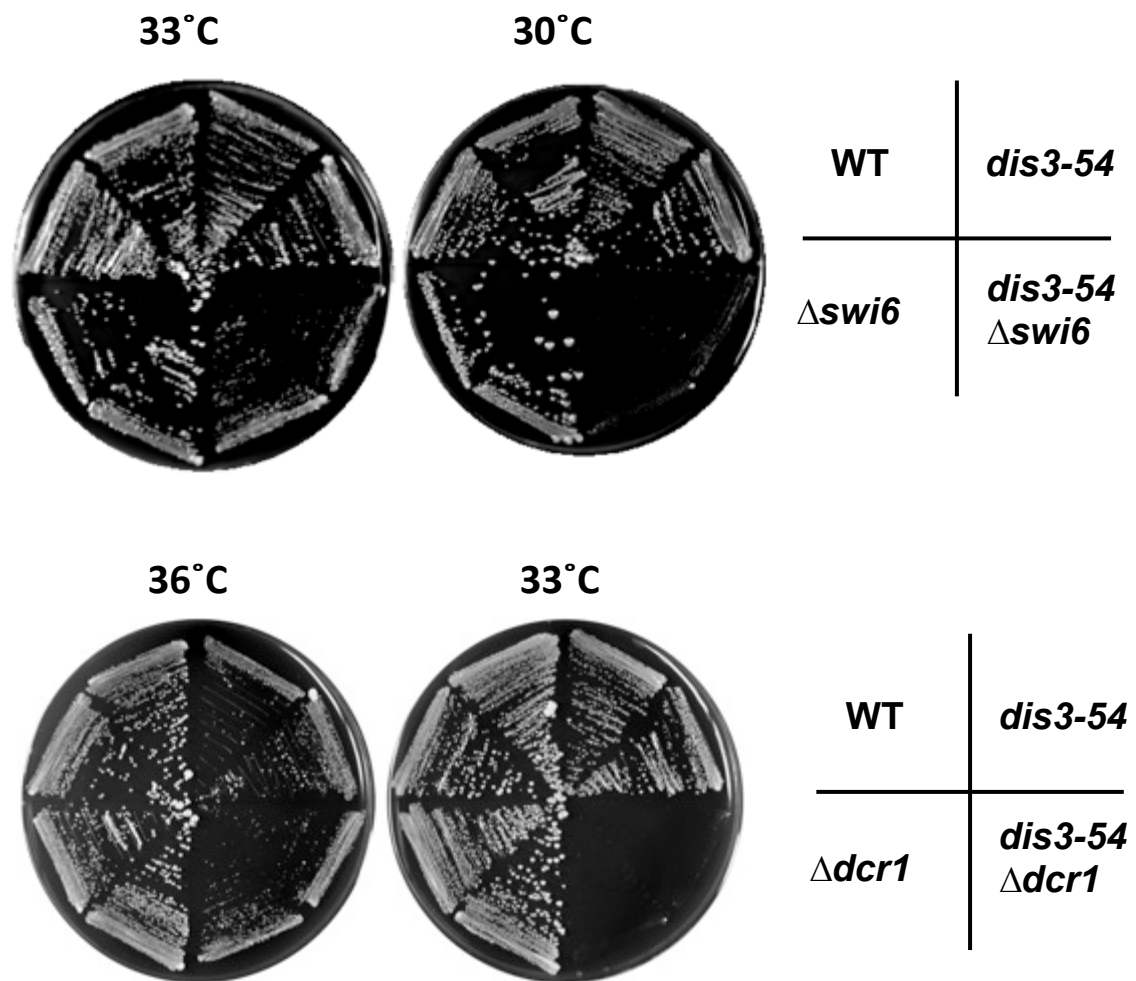


図22. *dis3*変異体は $\Delta swi6$ 、 $\Delta dcr1$ 変異体と強い遺伝的相互作用を示し、合成致死となる。

*dis3*変異体と $\Delta swi6$ 、 $\Delta dcr1$ 変異体それぞれの二重変異株を作成し、図に示す温度下にて固形培地上で培養した。*dis3* $\Delta swi6$ 二重変異株は30°Cの準許容温度においても合成致死を示した。*dis3* $\Delta dcr1$ 二重変異株は36°Cでのみ成育が可能であった。

ている

Dis3 とセントロメアとの関わりをより直接的に示すために、Dis3 タンパク質の細胞内局在をより詳細に調べた。これまでに木下らは抗 Dis3 抗体を用いた免疫染色により、Dis3 は核内とくに核小体領域と思われる部位に多く局在し一部がクロマチン上に存在することが示している (Kinoshita et al., 1993)。我々は、GFP を融合した Dis3 タンパク質を発現する遺伝子をゲノム上に組み込んだ野生株と *dis3* 変異体を作製し、それぞれの細胞が発現する Dis3-GFP 融合タンパク質 (Dis3wt-GFP, Dis3cs-GFP) の細胞内局在を許容温度と制限温度下で調べた (図 23.)。Dis3wt-GFP, Dis3cs-GFP とともに、細胞周期を通じて核内に局在した。特に第 3 染色体の rDNA 領域と考えられる特徴的な構造に重なるように強いシグナルが観察された。*dis* 表現型を示す制限温度下 *dis3* 変異体においては、姉妹核の一方のみにほとんどの Dis3cs-GFP シグナルが観察された。第 3 染色体を含む姉妹核であると思われた。以上の結果から、Dis3 タンパク質は細胞周期を通じて核内、特に核小体領域に多く局在していると結論した。この結果は木下らの免疫染色の結果と同様であった。そして、顕微鏡レベルにおいては野生型と変異型の Dis3 タンパク質に細胞内局在の明らかな違いは見いだせなかった。

1.14 Dis3 はセントロメア *otr* 領域と相互作用しており、その相互作用は *Dis3-P509L* 変異タンパク質では弱まっている

さらに詳細に核内の Dis3 タンパク質の局在を調べるために、クロマチン上に存在する Dis3 の一部がセントロメア DNA と物理的な相互作用があるかどうかを ChIP 法により調べた (図 24.)。野生型 Dis3、変異型 Dis3 タンパク質の C 末端に HA を tagging したタンパク質を細胞内で発現させ抗 HA 抗体にて ChIP 法を行った。それぞれの細胞内発現量には大きな違いはなかった。Dis3 は、セントロメア DNA 配列や染色体腕部上の *lys 1* 遺伝子 DNA とも弱いながら結合が認められたが、特に *otr* 領域の DNA と相互作用していることが分かった。また、変異型 Dis3 ではその *otr* との相互作用が弱くなっていることが分かった。以上の結果から、細胞内の Dis3 タンパク質の多くは核内の核小体領域に存在するが、一部の核内 Dis3 タンパク質はクロマチン上、特にセントロメア *otr* と相互作用していると結論した。また、その相互作用は *dis3* 変異体において弱まっていると結論した。

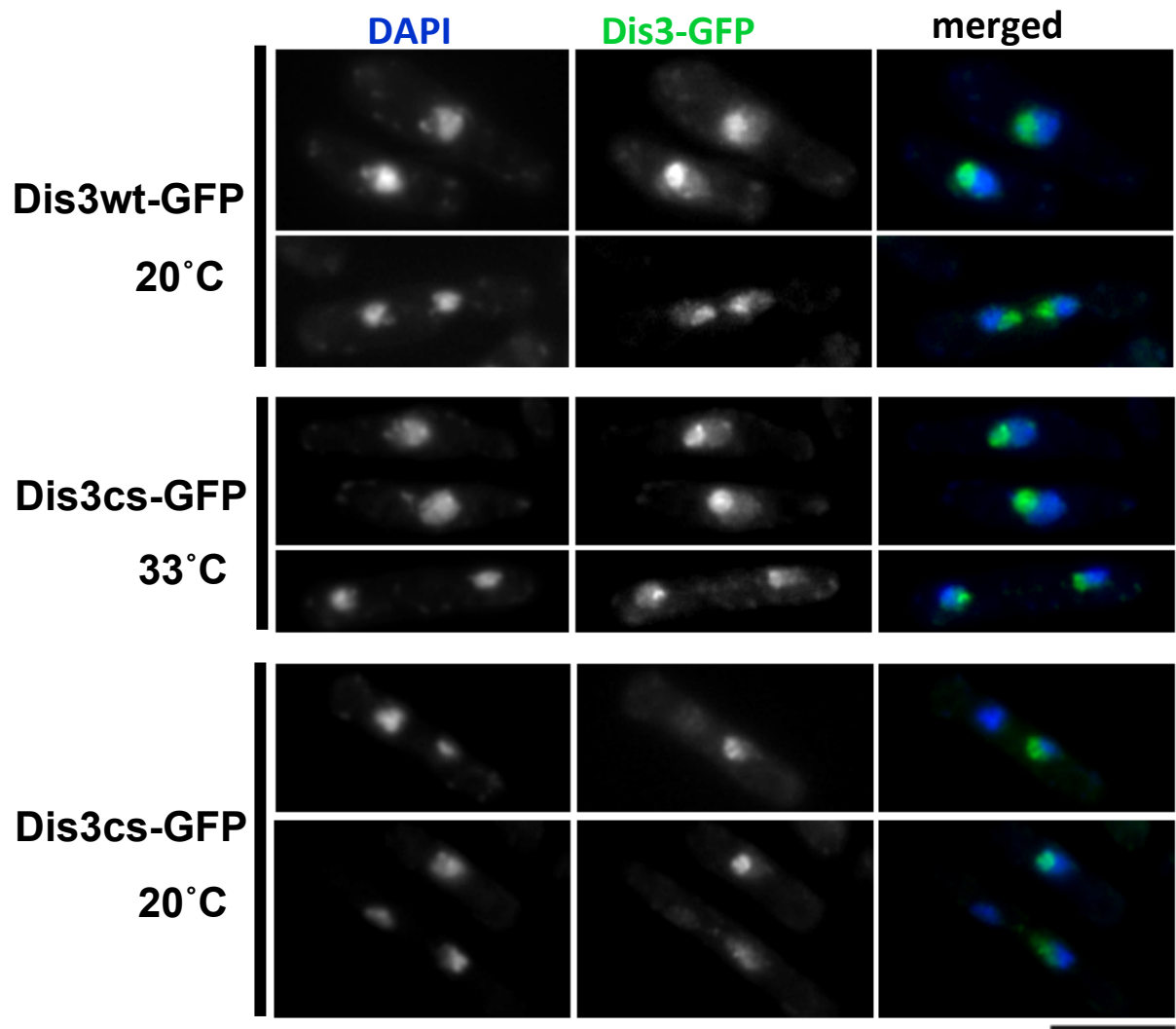


図23. 野生型、変異型Dis3タンパク共に細胞周期を通じて、核内、特に核小体領域に多く局在している。

C末端にGFPタグを融合した野生型、変異型Dis3タンパク質(Dis3wt-GFP, Dis3cs-GFP)を発現する遺伝子を染色体上に組み込んだ株をそれぞれ作成した。Dis3wt-GFP株は33°C許容温度にて、Dis3cs-GFP株は33°Cと20°Cそれぞれの温度下にて細胞をメタノール固定し、DNAはDAPI染色にて可視化しGFPシグナルとともに観察した。Dis3wt-GFP, Dis3cs-GFPともに、細胞周期を通じて核内に局在した。特に第3染色体のrDNA領域と考えられる特徴的な構造に重なるように強いシグナルが観察された。bar=10μm。

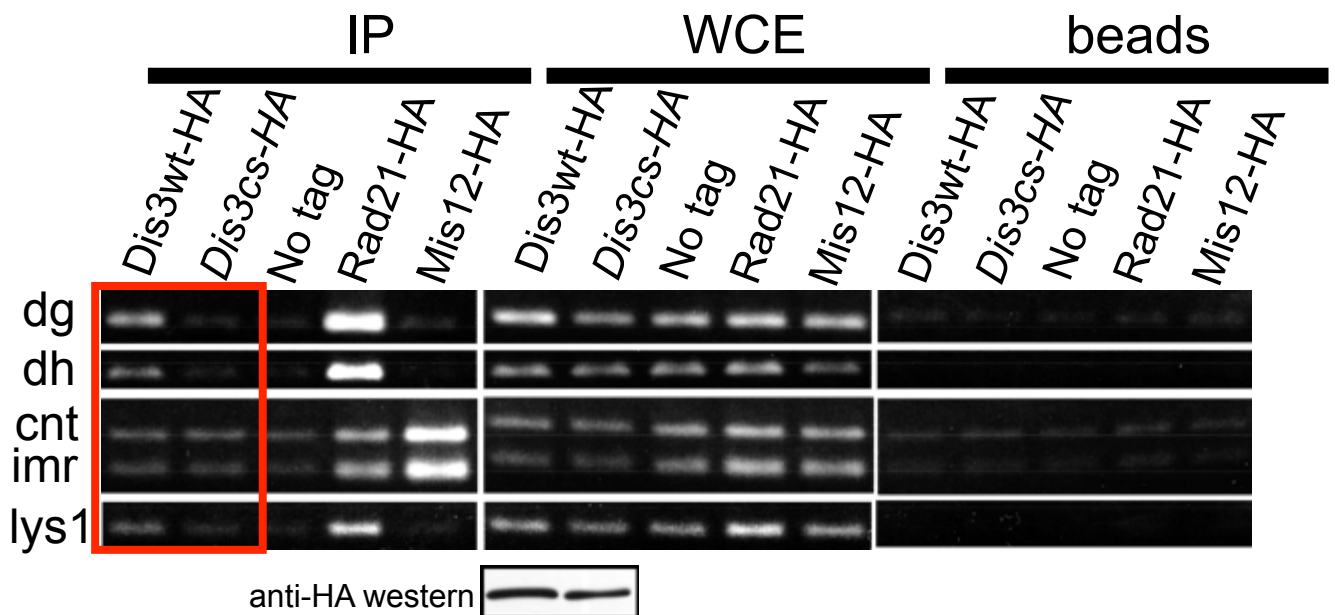


図24. Dis3タンパクはセントロメア *otr* 領域と相互作用しており、その相互作用は *Dis3-P509L* 変異タンパク質では弱まっている。

C末端にHAタグを融合した野生型、変異型Dis3タンパク質を発現する遺伝子を染色体上に組み込んだ株を作成し、33°C許容温度にて培養後、20°Cにシフトダウンし8時間後に細胞を回収した。抗HA抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)を行い、セントロメア(*cnt1*, *imr1*, *dg1*, *dh1*)と染色体腕部(*lys1*)に特異的なprimerを用いてPCRを施行した。セントロメア中央領域(*cnt1*, *imr1*)、*otr* 領域(*dg*, *dh*)に特異的に相互作用するタンパク質として、それぞれMis12-HA、Rad21-HAタンパク質を用いた。野生型Dis3タンパク質は*otr*、*lys1*領域においてコントロール(no tag)に比べより強い相互作用を認めた。一方、変異型Dis3タンパク質はそれらの相互作用が弱まっていた。

考察)

① *dis3* 変異体は、分裂期の動原体機能に欠損を示し、スピンドルチェックポイントタンパク Mad2 依存的な分裂期中期停止を起こす

我々は、*dis3* 変異体における分裂期紡錘体が正常な phase III を示さずに伸長を停止し、その停止がスピンドルチェックポイントタンパク質 Mad2 に依存することを示した。この結果は、*dis3* 変異体において正常な分裂期の動原体機能が欠損していること、つまり動原体と動原体微小管との安定な 2 方向性の結合の確立に欠損があることを示唆した。この可能性はその他の結果によっても支持された。1 つ目は、分裂期の *dis3* 変異体における Mad2 タンパク質の動原体局在である。Mad2 タンパク質はこれまでの研究から動原体微小管が結合していない動原体上に局在すると考えられている。*dis3* 変異体ではほぼすべての中期停止した細胞において、Mad2 が動原体上に観察された。このことは *dis3* 変異体において動原体微小管が結合できていない動原体が存在することを示唆している。2 つ目は、*dis3Δmad2* 変異体の染色体不均等分配表現型である。*dis3* 変異体における Mad2 依存的な中期停止が、動原体機能の欠損と関係なく起こっている場合（例えば、動原体における Mad2 タンパク質活性化の解除に欠損がある場合など）、*dis3Δmad2* は染色体分配自体には異常を示さないはずである。しかし、*dis3Δmad2* 変異体は 60% もの高い頻度で分裂期に姉妹染色体の不均等分配を示した。このことは、*dis3* 変異体において正常な動原体機能が欠損していることを強く示唆している。3 つ目は、TBZ 感受性である。微小管を不安定化する薬剤への感受性は多くの動原体変異体で認められている特徴の一つである。4 つ目は、*dis3* 変異体における中期紡錘体の長さである。*dis3* 変異体における中期紡錘体長 (4.0 μm) は、野生株 (2.5 μm) に比べて明らかに伸長していた。これまでに *mis12* を始めとする動原体機能欠損を示す変異体において同様に中期紡錘体長が伸長することを五島らが報告している (Goshima et al., 1999, Goshima et al., 2000)。原因として、動原体と動原体微小管の結合が不安定になることで、極間微小管の間の pushing force が勝るため中期紡錘体が伸長してしまうのではないかと考えられているが、まだ詳細な原因は明らかにされていない。*dis3* 変異体においても同様の原因で分裂期中期紡錘体長が伸長している可能性は考えられる。以上の 5 つの結果は、*dis3* 変異体において分裂期の動原体機能が欠損しているという結論を支持している。我々は、Dis3 タンパク質が分裂期の動原体機能に重要な役割を果たしていると結論した。

②分裂酵母 Dis3 は RNA 分解酵素である

これまでの報告から、Dis3 タンパク質は酵母からヒトまでほとんどの真核生物で進化的に保存されており、その C 末端に大腸菌の 3' → 5' exoribonuclease である RNaseII や RNB タンパク質と相同な領域 (RNB domain) を有することから、RNaseII family に属する 3' → 5' exoribonuclease であると考えられてきた (Coburn et al., 1996、Zuo et al., 2006)。また、出芽酵母 Dis3 は 3' → 5' exoribonuclease 複合体である Exosome のコンポーネントの一つとしても同定された (Mitchell et al., 1997)。我々は、分裂酵母 Dis3 が RNase 活性を持つかどうかを *in vitro* にて検討し、精製した Dis3 タンパク質が *in vitro* RNase 活性を有することを示した。しかし、今回用いた精製方法では、*in vitro* で観察された RNA 分解活性が Dis3 以外の精製過程で混入した RNase に由来する可能性は否定できない。とくに、Dis3 を含む Exosome 複合体は、10 個あまりの既知のコンポーネントの全てが RNase であり、Dis3 を免疫沈降した場合にその他のコンポーネントが共沈物に含まれる可能性は十分に考えられる。我々は免疫沈降物をアクリルアミドゲルにて電気泳動し、クマシーブルー染色にて確認したが Dis3-GST を示す 130kDa のバンド以外には目立ったタンパク質は認めないことを示した (補遺図. 1)。しかし、微量の混入タンパク質による活性を見ている可能性は残る。今後、より詳細に分裂酵母 Dis3 の活性を調べる (基質特異性など) ためには、大腸菌など Exosome を持たない生物を利用した組み換えタンパク質の精製が必要になると思われる。

③ *dis3* 変異体の *P509L* 変異は Dis3 の RNase 活性を低下させる

ゲノム DNA の配列を解析した結果、*dis3* 変異体の変異部位が RNB ドメイン中に存在することが分かった (*P509L*)。変異により置換されるプロリン残基は酵母からヒトまで真核生物では高度に保存されており、Dis3 の機能に重要な働きを持つことが予想された。我々は *in vitro* RNase assay により、*P509L* 変異が Dis3 の RNase 活性を低下させることを示した。これまでに大腸菌の RNaseII タンパク質の結晶構造解析が明らかにされているが、それによると、509 番目のプロリン残基は活性中心からは離れた位置に存在していることが分かっており活性中心の構造にどのような影響を与えるかは不明である (Dziembowski A et al., 2007)。このプロリンは大腸菌の RNaseII や RNB タンパクでは保存されておらず、真核細胞の Dis3 ホモログでのみで保存されている。もしかすると、このプロリン残基は、真核細胞においてのみ必要な Dis3 の機能に重要な働きを持つのかもしれない。*P509L* 変異が Dis3 タンパク質の *in vitro* RNase 活性を低下させ、分裂期の動原体機能欠損を引き起こすことから、Dis3 の RNase 活性が動原体機能に必要である可能性がある。*in vitro* にお

いて RNase 活性が低下した *T8084*-Dis3 プラスミドが *dis3* 変異体を相補できないことも、Dis3 の RNase 活性が変異体の表現型と直接関係している可能性を示唆する。今後、*dis3* 変異体において蓄積する RNA を microarray により解析することで分裂期表現型の原因となる基質 RNA を特定することが可能かもしれない。

④ *dis3* 変異体はセントロメア *otr* 領域の silencing に欠損を示す

分裂酵母 Dis3 が RNA 分解酵素であり、その変異体がセントロメア機能に欠損を示すという結果は、Dis3 がセントロメア RNA の代謝機構の 1 因子として機能している可能性を示唆する。それを支持する結果として、我々は *dis3* 変異体においてセントロメアヘテロクロマチン機能が欠損していることを明らかにした。*dis3* 変異体では、*otr* や *mat* locus などに組み込んだマーカー遺伝子の転写抑制が欠損し、*otr* 転写産物が蓄積していた。では、Dis3 は実際に Dcr1、RITS 複合体、RDRC 複合体などと同じく RNAi 経路の中で働いているのだろうか。本論文のいくつかの結果は、Dis3 が RNAi 経路で働いていることに否定的であった。まず 1 つは、*dis3* 変異体が Dcr1 による siRNA の形成や RITS 複合体への siRNA の取り込みには異常を示さなかったことである。このことは、*otr* から転写された RNA をもとにして siRNA が形成され、RITS に取り込ませる一連の過程に Dis3 が必要ないことを示している。また、*dis3* 変異体と一連の RNAi 変異体では、その表現型が明らかに異なっている。Dcr1、Rdp1、Swi6 などのほとんどの RNAi 経路、ヘテロクロマチン経路の因子は成育に必須ではなく、それらの遺伝子破壊株はいずれも非常によく似た表現型を示す。分裂期には lagging chromosome 表現型を示し、また *dis3* で認めるようなスピンドルチェックポイントによる中期停止は観察されない。これらは *dis3* 変異体で起きているセントロメア機能の異常が RNAi 経路によるヘテロクロマチン化の異常だけでは説明できないことを示している。

本研究の発表後、RNAi に依存しない核内の RNA 分解経路がセントロメア *otr* の gene silencing に寄与していることが明らかにされた (Buhler et al., 2007)。核内 RNA 分解経路には、Exosome と poly(A) polymerase 複合体の一つである TRAMP 複合体 (Cid14 を含む) が必要である。現在では、分裂酵母には RNAi を中心とする gene silencing と Exosome を中心とする gene silencing の 2 つの経路があると考えられ始めている (Wang et al., 2008, Bernard PB et al., 2010 など)。前者は Dicer による転写産物の分解 (転写後抑制: post transcriptional gene silencing; PTGS) とヒストン修飾によるクロマチン構造変化 (転写抑制: transcriptional gene silencing; TGS) を起こす。後者は、TRAMP 複合体が転写された RNA の 3' に poly A を付加し、それにより Exosome 複合体が RNA を分解するという PTGS が主な働きである。前者はセントロメアでしか機能していないが、後者はセントロメアのみならず、テロメアや *mat* locus などの全ての染色体領域で機能しているようである。

後者の Exosome による gene silencing はより進化的に古い古典的な gene silencing のメカニズムなのかもしれない。*dis3* 変異体で認める silencing 欠損は Exosome 複合体による PTGS の欠損であると考えて良さそうである。RNAi による silencing 経路は *dis3* 変異体では正常に機能していると考えられる。RNAi 変異体と比較して *dis3* 変異体での *otr* 転写産物の蓄積が少ないことは、RNAi 経路での TGS が正常に働いているため転写の量自体が少ないためかもしれない。RNAi 変異体と *dis3* 変異体が強い合成致死性を示すのは、二重変異体のなかでは2つの silencing 経路が共に欠損するためなのかもしれない。

⑤ *dis3* 変異体はセントロメア中央領域の silencing にも欠損を示す

dis3 変異体は RNAi 変異体と異なり *otr* 領域だけではなくセントロメア中央領域 (*cnt*, *imr*) の silencing にむしろより強い欠損を示していた。この中央領域の silencing 異常は、セントロメアタンパク質の変異体である *mis6* や *cnp1* で認められるものと同様であり、RNAi 変異体では認められない (Partridge *et al.*, 2000, Choi *et al.*, 2011)。セントロメア中央領域は、セントロメア特異的なヒストン H3 である Cnp1 を含み、MNase による分解でスミアパターンを示すことから、特有の高次クロマチン構造を形成していると考えられており、*mis6*, *mis12* などの変異体ではこの構造が欠損している (Saitoh *et al.*, 1997, Goshima *et al.*, 1999, Takahashi *et al.*, 2000)。同様の欠損が *dis3* で起こっている可能性について検討したが、*dis3* 変異体では中央領域特有の高次構造は正常に形成されていた。*dis3* 変異体で起こっているセントロメア中央領域の silencing 異常がどのように起こっているのかは今回の研究では明らかには出来なかった。しかし、前項で記した Exosome による silencing 経路が中央領域でも働いていることがその後いくつか報告されている (Buhler *et al.*, 2007, Choi *et al.*, 2011)。セントロメアの中央領域でも転写が実際に起こっており、その転写産物が *dis3* 変異体で蓄積することも示されている (Choi *et al.*, 2011)。このように Dis3 を含む Exosome 複合体は中央領域からの転写産物の分解にも寄与しているようである。RNAi 変異体との分裂期表現型の違いはこのためであるかもしれない。興味深いことに、5' → 3' RNA 分解酵素である Dhp1 や、RNA polyadenylation factor である Pfs2 の温度感受性変異体でも、*dis3* と同様に中央領域の silencing に欠損を示すことが示された (Choi *et al.*, 2011)。*dhp1* 変異体や *pfs2* 変異体は、*dis3* と非常によく似た染色体分離異常表現型を示し、ともにスピンドルチェックポイントを活性化させることが明らかにされている (Shobuike *et al.*, 2001, Bernard *et al.*, 2010)。中央領域も *otr* と同様に常に転写されており、その転写産物がこれら RNA 分解経路依存的に常に分解され続けているのかもしれない。

⑥Dis3 の動原体における機能

我々は *dis3* 変異体において分裂期の動原体機能が欠損しており、スピンドルチェックポイントにより細胞周期が分裂期中期にて停止することを示した。それでは、Dis3 の染色体分離における機能とはいったい何であろうか？我々は、*dis3* 変異体においてセントロメア全体の silencing が欠損していること、セントロメア *otr* 領域からの転写産物が蓄積していることを示した。また、Dis3 タンパク質が RNA 分解活性を有し、*dis3* 変異タンパク質ではその活性が低下していること、また Dis3 がセントロメア DNA と直接相互作用しうること示した。これらの結果からはいくつかの Dis3 の機能についての仮説が考えられる。

最初の仮説は、Dis3 がセントロメア *otr* の silencing を介してコヒーシン複合体の *otr* への集合に寄与しているというモデルである。*otr* 領域のヘテロクロマチンは *otr* へのコヒーシン複合体の集合に必要であることが示されており、*otr* へのコヒーシンの集合が欠損することで動原体機能が欠損することが *mis4* 変異体を解析した豊田らの報告により示されている (Bernard et al., 2001, Toyoda et al., 2002)。しかし、*otr* へのコヒーシンの集合に欠損を示す変異体の表現型は、分裂後期における lagging chromosome であり、*dis3* 変異体とは明らかに異なっている。また、*dis3* 変異体において、*otr* 領域におけるコヒーシン複合体の一つである Rad21 の結合は野生株と比較して大きな変化は認めなかった。以上より、*dis3* 変異体の動原体機能欠損をコヒーシンの loading 異常のみで説明することは困難と思われる。二つ目の仮説は、*dis3* 変異体において動原体機能に必須なタンパク質の mRNA の量が異常になり、そのために間接的に動原体欠損を示している可能性である。しかし、Dis3 タンパク質が直接セントロメア DNA と相互作用することや、セントロメア gene silencing 欠損を示す事を考えると、むしろ Dis3 自身が直接的に動原体欠損の原因となっている可能性の方が高いと思われる。最後の仮説は、Dis3 がセントロメアから転写される不要な RNA を分解することにより、分裂期の動原体と動原体微小管との結合を保障するという可能性である。Exosome は、正常なタンパク質をコードする mRNA 以外の異常な RNA を選択的に分解する “RNA quality control” に必要であることが知られている (Houseley et al., 2006)。Exosome subunit の Rrp6 破壊株では転写産物の中でもとりわけタンパク質をコードしない antisense RNA やセントロメア RNA が蓄積することが示されている (Zhang et al., 2011)。分裂酵母セントロメアは、かつて考えられていたイメージと異なり、中央領域も外側領域も活発に転写されていると認識され始めている。外側の *otr* 領域は Exosome と RNAi 経路の両者が働いているが、中央領域は Exosome や Dhp1, Spf2 などの RNA 分解経路の転写抑制機構しか明らかにされていない。これらの変異体では、*otr*、*imr*、*cnt* からの転写産物が蓄積する。そして、スピンドルチェックポイント依存的に中期に停止するよく似た表現型を示す (Shobuike et al., 2001, Bernard et al., 2010)。これらの変異体では、

セントロメア由来の RNA 分子自身がセントロメアの周囲に蓄積し、それらが邪魔となって分裂期の動原体微小管と動原体との相互作用が不安定になってしまうのかもしれない (図 25.)。1979 年の電子顕微鏡を用いたイモリのセントロメア観察の報告ではセントロメア周囲に多くの RNA が存在することが示されている (Rieder, 1979)。今後、中央領域に人為的に誘導可能な転写プロモーターを挿入することでセントロメアの転写自体がセントロメア機能を欠損させるのかを検討できるのかもしれない。

⑦ヒト細胞における Dis3 ホモログの働き

ヒトでは Dis3 ホモログとして、これまでに 2 遺伝子座、3 つのタンパク質が存在することが報告されており、それぞれ、hDis3、hDis3L1、Dis3L2 と呼ばれている (Atsuti et al., 2012, Staals et al., 2010, Tomecki et al., 2010)。Dis3L1 と Dis3L2 は共通の遺伝子から転写される splicing バリエーションである。Dis3 バリエーションは細胞内の異なった部位に局在することが示されており、hDis3 は核内と細胞質に、hDis3L1、L2 は細胞質に局在する (Atsuti et al., 2012, Tomecki et al., 2010)。ヒトでは hDis3 と hRrp6 以外の Exosome component 9 つが複合体のコア部分を形成しており、hDis3 と hRrp6 がそれぞれの局在部位でコア複合体と結合することで Exosome が多彩な機能を担うことが出来ると、いうモデルが提示されている (Tomecki et al., 2010)。その中で、hDis3L2 と Rrp6 はノックダウンにより染色体分離欠損を示し、hDis3L2 RNAi では結果として ploidy の低下した異常な細胞が生じることが示されている (Atsuti et al., 2012, Graham et al., 2009)。しかし、hDis3L2 RNAi により、Aurora B kinase や Cyclin B1 などの細胞周期に関連するタンパク質の mRNA 量に変化することから、さまざまなタンパク質の mRNA の分解を調節することで間接的に染色体分配に寄与しているのかもしれない。また、興味深いことに、hDis3 は大腸癌の原因遺伝子の一つとして、また、hDis3L2 は先天性過形成症候群の一つとして知られる Perlman 症候群や Wilms 腫瘍の原因遺伝子としても同定されている。このことから、hDis3 がヒトにおいて細胞の腫瘍化、癌化に関わっていることは明らかである (Lim et al., 1997, Atsuti et al., 2012)。

以上の結果を考えると、Dis3 タンパク質は生物種を越えて分裂期での染色体分配に必須な働きを担っている可能性は高い。その機能を明らかにすることは、染色体分配における種を越えた普遍的なメカニズムを理解することに繋がり、そしてさまざまな人の疾患の病態を理解することにも繋がることから、非常に重要であると考えられる。

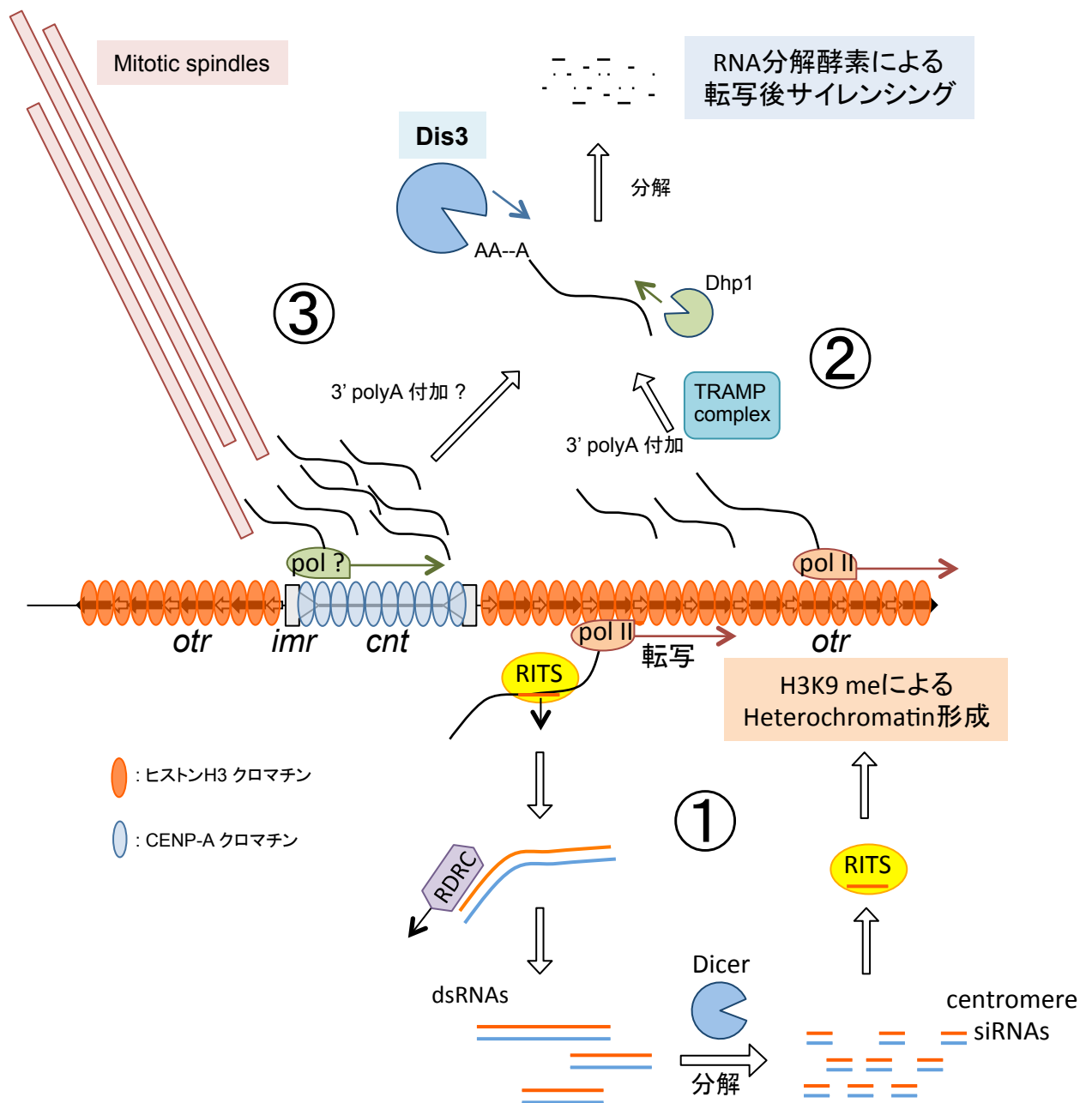


図25. Dis3 のセントロメアにおける役割(モデル)

分裂酵母セントロメア (*cnt*, *imr*, *otr*) を示す。セントロメアの全ての領域は転写を受けている。*otr* はRNA polymerase II (pol II) により転写されている。中央領域の転写酵素は不明 (pol ?)。*otr* の silencing には2つの経路がある (① + ②)。①はRNAiによる PTGS と TGS。②は RNA 分解酵素 (3'→5': Dis3、5'→3': Dhp1) による PTGS。Exosome や Dhp1 は中央領域の silencing にも働いている (③)。
②もしくは③の欠損はスピンドルと動原体との結合に障害を引き起こし、スピンドルチェックポイントタンパク質により検知される。

材料と方法)

菌株と培地

分裂酵母の培養には YPD (1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose) を、最小培地には EMM2 (Mitchison, 1970) を用い、必要に応じてサプリメントを添加した。胞子形成には SPA 培地を用いた。全てのプレート培地は 2% アガロースを加え作成した。TBZ (チアベンダゾール; SIGMA 社) や Kanamycin (カナマイシン) は使用直前あるいはプレート作成時に培地に混和した。

大腸菌の培養は LB 寒天培地を使用した。大腸菌株としては、MM294 株を主に使用した。

HeLa 細胞の培養液としては、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO) にウシ胎児血清 (Filton) を体積比 10% になるように添加し、抗生物質として Penicillin-Streptomycin (GIBCO)、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO) をそれぞれ 1% 濃度で加えた。

本論文で使用した主な分裂酵母株は以下の通り、

972:h-

975:h+

HM123:h-leu1

dis3-54:h-leu1

Δmad2:h-leu1 ura4 mad2::ura4

nda2:h-leu1

mis6:h-leu1

mis12:h-leu1

cnp1:h-leu1

Δswi6:h-leu1 ura4 ade6 swi6::ade6

Δdcr1:h-leu1 ura4 dcr1::kan^r

Δrdp1:h-leu1 ura4 rdp1::kan^r

Δago1:h-leu1 ura4 ago1::kan^r

Δcnp3:h-leu1 cnp3::kan^r

プラスミド

プラスミドの大量調整はアルカリ法を用い、精製には塩化セシウム密度勾配遠心を用いた。少量調整は boil 法あるいは、QIAprep (QIAGEN) キットを用いた。染色体への組み込み用ベクターにはロイシンマーカを持つ pTC11 もしくはウラシルマーカを持つ pYC6 を用いた。Dis3-GST タンパク質の大量発現に用いたベクターは培地からのチアミン除去により発現が誘導される *nmt1* プロモーターを含む pREP1 を使用した (Maundrell 1990)。

形質転換

分裂酵母の形質転換にはリチウム法を用いた (Ito et al., 1983)。大腸菌の形質転換にはカルシウム法を用いた (Maniatis et al., 1982)。ヒト培養細胞への形質転換は Oligotfectamine (Invitrogen) を用いた。

免疫染色

分裂酵母の免疫染色は Hagan and Hymans (1988) に従った。培養液に 3% パラホルムアルデヒドと 0.25% グルタルアルデヒドを添加して 1 時間固定し、1 次抗体、2 次抗体をそれぞれ 8 時間程度室温で反応させた。微小管の染色には TAT1 抗体 (Woods A et al., 1989) を用いた。GFP 融合タンパクの細胞内局在は主にメタノール固定で行った (Hagan and Hymans, 1988)。

in vitro RNase 法

in vitro RNase assay は Mitchell P et al., (1997) に従った。*nmt1* プロモータの下流に Dis3-GST 融合タンパク質を発現する遺伝子を組み込んだ多コピープラスミドを作製し、野生株の分裂酵母にプラスミドを形質転換した。培地からチアミンを除去することにより発現を誘導後、発現がピークに達する 19 時間目に集菌した。細胞抽出液からグルタチオンセファロースビーズを用いて GST タンパク質を精製した。精製したタンパクをアクリルアミドゲル電気泳動を行い、タンパク量を計測するために、BSA を 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 μ g 同一ゲルに泳動した。泳動後のゲルをクマシーブルー染色し、Molecular Imager にて定量した。この精製方法により、細胞濃度 1.0×10^7 /ml の 2 リットルの培養液から、約 75 μ g (Dis3-GST 550 pmol 相当) を精製できる。反応液の組成は、10mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM DTT, 100mg/ml BSA, 5.0mg Yeast RNA, 0.8U/ml RNasin (Promega) である。氷上で反応液に精製タンパクを加え、37°C もしくは 20°C に設定した Heat block 上に静置することで反応を開始した。反応は 10% volume の 8% SDS, 100mM EDTA 溶液を加え停止させ、反応液と同量の 50% ホルムアルデヒド, loading dye 液を加え 65°C で 15 分間 RNA を変性させた。その後、変性アガロースゲル (1.2% agarose, 20mM MOPS, 1mM EDTA, 50mM sodium acetate, 2.2M ホルムアルデヒド) で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド (EtBr) で染色した。EtBr で染色された RNA の定量には、Molecular Imager GS-700 (Bio-Rad) を使用した。

small RNA Northern blot, RT-PCR

基本的な方法は Li et al., (2005) と Sugiyama et al., (2005) に従った。

CHIP 法

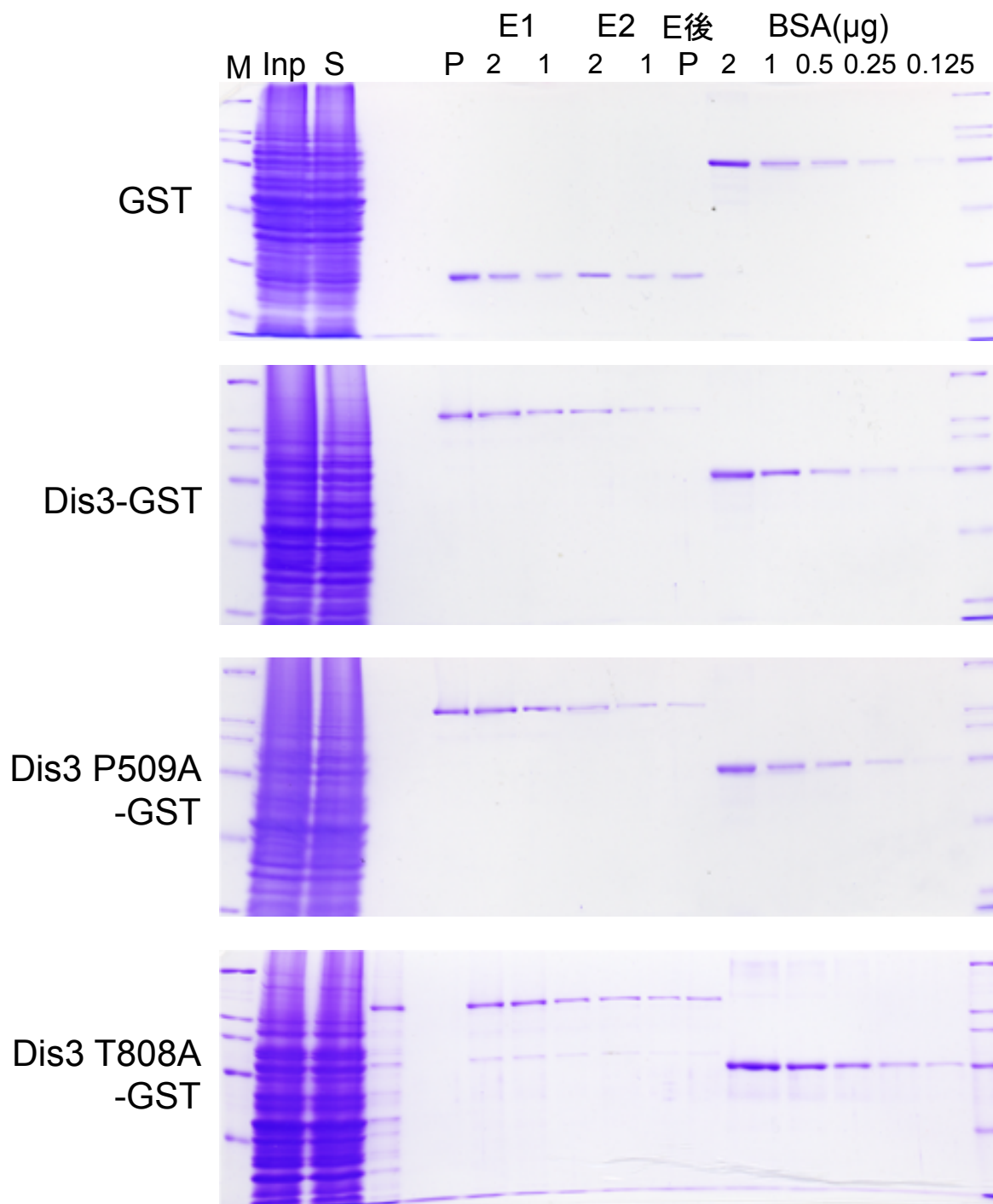
基本的には Saitoh S et al., (1997)に従った。電気泳動は2.5%アガロースゲルで行い、エチジウムブロマイド (EtBr) で染色した。本論文で使用したprimerは以下の通り、

For dg1: 5' - CTATAAATGGTTGACACAGC -3' & 5' - CAAGCCAAGTCAGAGCAG -3'

For dg3: 5' - TGGTACCGAAGCACTGAC -3' & 5' - ACTATCACTACTCTGAAGAC -3'

Chromatin MNase 分解

基本的には Takahashi et al., (1992)に従った。MNase は Worthington 社のものを 250U/ml の濃度で用いた。サザンブロットのプローブとしては、pKT110、pKT108、pYC148 を *cnt*、*imr*、*dg* として使用した。



補遺 図1. GST融合Dis3タンパク質の精製

*nmt1*プロモータの下流にDis3-GST融合タンパク質を発現する遺伝子を組み込んだ多コピープラスミドを作製した。野生株の分裂酵母にプラスミドを形質転換し、発現を誘導後、発現がピークに達する19時間目に集菌した。細胞抽出液からグルタチオンセファロースビーズを用いてGSTタンパク質を精製した。精製したタンパクをアクリルアミドゲル電気泳動を行い、タンパク量を計測するために、BSAを1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 μg 同一ゲルに泳動した。泳動後のゲルをクマシーブルー染色し、Molecular Imagerにて定量した。図の上より、GSTのみ、Dis3-GST、Dis3 P509A-GST、Dis3 T808A-GSTタンパク質のクマシーブルー染色の結果を示す。lane左より、molecular weight marker(M)、Input (Inp)、Sup(S)、wash後のPellet(P)、溶出1回目のElute(E1)を2 μl 、1 μl 、溶出2回目のElute(E2)を2 μl 、1 μl を表す。定量の結果、16pmol/ μl 、2.9pmol/ μl 、4.7pmol/ μl 、1.28pmol/ μl であった。Dis3 T808A-GSTタンパク質は*in vitro* RNase assayに使用するために、2.5pmol/ μl になるように濃縮を行った後実験に使用した。

参考文献)

- Aoki K, Nakaseko Y, Kinoshita K, Goshima G, Yanagida M. (2006). CDC2 phosphorylation of the fission yeast *dis1* ensures accurate chromosome segregation. *Curr Biol.* 16: 1627-35.
- Atsuti D, Morris MR, Cooper WN, Staals RH, Wake NC, Fews GA, Gill H, Gentle D, Shuib S, Ricketts CJ, Cole T, van Essen AJ, van Lingen RA, Neri G, Opitz JM, Rump P, Stolte-Dijkstra I, Müller F, Pruijn GJ, Latif F, Maher ER. (2010) Germline mutations in *DIS3L2* cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. *Nat Genet.* 44: 277-84.
- Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesin at centromeres. *Science.* 294: 2539-42.
- Bernard PB, Drogat J, Dheur S, Genier S and Javarzat JP. (2010). Splicing factor Spf30 assists exosome-mediated gene silencing in fission yeast. *M.C.B.* 30: 1145-1155.
- Beinhauer JD, Hagan IM, Hegemann JH, Fleig U. (1997). Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J Cell Biol.* 139:717-28.
- Buhler M, Haas W, Gygi SP and Moazed D. (2007). RNAi-dependent and -independent RNA turnover mechanisms contribute to heterochromatic gene silencing. *Cell.* 129: 707-721.
- Cheeseman IM, Niessen S, Anderson S, Hyndman F, Yates JR 3rd, Oegema K, Desai A. (2004). A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. *Genes Dev.* 18: 2255-68.
- Chen E. S, Zhang K, Nicolas E, Cam HP, Zofall M, Grewal S. I. S. (2008). Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature.* 451: 734-737.
- Chikashige Y, Kinoshita N, Nakaseko Y, Matsumoto T, Murakami S, Niwa O, Yanagida M. (1989) Comparison motifs and repeat symmetry in *S.pombe* centromeres: direct

analysis by integration of NotI restriction sites. *Cell*. 57:739-51.

Choi ES, Stralfors A, Castillo AG, Durand-Dubief M, Ekwall K and Allshire RC. (2011). Identification of noncoding transcripts from within CENP-A chromatin at fission yeast centromeres. *J.B.C.* 286: 23600-23607.

Clarke L, Amstutz H, Fishel B, Carbon J. (1986). Analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:8253-7.

Clarke L and Baum MP. (1990) Functional analysis of a centromere from fission yeast: a role for centromere-specific repeated DNA sequences. *Mol Cell Biol.* 10:1863-72.

Coburn GA, Mackie GA. (1996). Overexpression, purification, and properties of *Escherichia coli* ribonucleaseII. *J Biol Chem.* 271:1048-53.

Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E, Seraphin B. (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol.* 14:15-22

Fishel B, Amstutz H, Baum M, Carbon J, Clarke L. (1988). Structural organization and functional analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* 8:754-63.

Funabiki H, Kumada K, Yanagida M. (1996). Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *EMBO J.* 15:6617-28

Garcia MA, Vardy L, Koonrugsu N, Toda T. (2001). Fission yeast ch-TOG/XMAP215 homologue Alpl4 connects mitotic spindles with the kinetochore and is a component of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *EMBO J.* 20:3389-401

Goshima G, Saitoh S, Yanagida M. (1999). Proper metaphase spindle length is determined by centromere protein Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. *Genes Dev.* 13:1664-77.

- Goshima G, Kiyomitsu T, Yoda K, Yanagida M. (2003). Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J Cell Biol.* 160:25-39
- Goto DB and Nakayama J. (2012). RNA and epigenetic silencing: insight from fission yeast. *Develop. Growth Differ.* 54: 129-141
- Graham AC, Davis SM, Andrulis ED. (2009). Interdependent nucleocytoplasmic trafficking and interactions of Dis3 with Rrp6, the core exosome and importin- α 3. *Traffic.* 10:499-513.
- Grewal SI. (2010). RNAi-independent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Curr Opin Genet Dev.* 20:134-41.
- Hagan IM, Hyams JS (1988) The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 89 : 343-357.
- Hagan I, Yanagida M. The product of the spindle formation gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *J Cell Biol.* 1995 May;129(4):1033-47.
- Hahnenberger KM, Carbon J, Clarke L. (1991). Identification of DNA regions required for mitotic and meiotic functions within the centromere of *Schizosaccharomyces pombe* chromosome I. *Mol Cell Biol.* 11:2206-15.
- Hayashi T, Fujita Y, Iwasaki O, Adachi Y, Takahashi K, Yanagida M. (2004). Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell.* 118:715-29.
- Holland S, Ioannou D, Haines S, Brown WR. Comparison of Dam tagging and chromatin immunoprecipitation as tools for the identification of the binding sites for *S. pombe* CENP-C. *Chromosome Res.* 2005;13(1):73-83.

Houseley J, LaCava J, Tollervey D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:529-39.

Kalitsis P, Fowler KJ, Earle E, Hill J, Choo KH. (1998). Targeted disruption of mouse centromere protein C gene leads to mitotic disarray and early embryo death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1136-41.

Kinoshita K, Goebel M, Yanagida M. (1991). The fission yeast *dis3+* gene encodes a 110-kDa essential protein implicated in mitotic control. *Mol Cell Biol.* 11:5839-47.

Kiyomitsu T, Obuse C, Yanagida M. (2007). Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev Cell.* 13:663-76

Li F, Goto DB, Zaratiegui M, Tang X, Martienssen R, et al. (2005) Two novel proteins, *dos1* and *dos2*, interact with *rik1* to regulate heterochromatic RNA interference and histone modification. *Curr Biol* 15: 1448-1457.

Lim J, Kuroki T, Ozaki K, Kohsaki H, Yamori T, Tsuruo T, Nakamori S, Imaoka S, Endo M, Nakamura Y. (1997). Isolation of murine and human homologues of the fission-yeast *dis3+* gene encoding a mitotic-control protein and its overexpression in cancer cells with progressive phenotype. *Cancer Res.* 57:921-5.

Matsumoto T, Fukui K, Niwa O, Sugawara N, Szostak JW, Yanagida M. (1990). Identification of healed terminal DNA fragments in linear minichromosomes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* 7:4424-30.

Meeks-Wagner D, Hartwell LH. (1986). Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission. *Cell.* 44:43-52.

Melluh PB, Koshland D. (1995). Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell.* 6:793-807.

Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M, Tollervey D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*. 91:457-66.

Murakami S, Matsumoto T, Niwa O, Yanagida M. (1991). Structure of the fission yeast centromere cen3: direct analysis of the reiterated inverted region. *Chromosoma*. 101:214-21.

Nabeshima K, Kurooka H, Takeuchi M, Kinoshita K, Nakaseko Y, Yanagida M. (1995). p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites. *Genes Dev*. 9:1572-85.

Nabeshima K, Nakagawa T, Straight AF, Murray A, Chikashige Y, Yamashita YM, Hiraoka Y, Yanagida M. (1998). Dynamics of centromeres during metaphase-anaphase transition in fission yeast: Dis1 is implicated in force balance in metaphase bipolar spindle. *Mol Biol Cell*. 9:3211-25.

Nakaseko Y, Adachi Y, Funahashi S, Niwa O, Yanagida M. (1986). Chromosome walking shows a highly homologous repetitive sequence present in all the centromere regions of fission yeast. *EMBO J*. 5:1011-21

Nakaseko Y, Kinoshita N, Yanagida M. (1987). A novel sequence common to the centromere regions of *Schizosaccharomyces pombe* chromosomes. *Nucleic Acids Res*. 15:4705-15

Nakaseko Y, Goshima G, Morishita J, Yanagida M. (2001). M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast: microtubule-associating Dis1 and Mtc1 display rapid separation and segregation during anaphase. *Curr Biol*. 11:537-49.

Niwa O, Matsumoto T, Chikashige Y, Yanagida M. (1989). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome deletion derivatives and a functional allocation of their centromere. *EMBO J*. 8:3045-52

Obuse C, Iwasaki O, Kiyomitsu T, Goshima G, Toyoda Y, Yanagida M. (2004). A conserved

Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol.* 6:1135-41

Oegema K, Desai A, Rybina S, Kirkham M, Hyman AA. (2001). Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* 153:1209-26.

Ohkura H, Adachi Y, Kinoshita N, Niwa O, Toda T, Yanagida M. (1988). Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutant of the *Schizosaccharomyces pombe* *dis* genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *EMBO J.* 7:1465-73.

Partridge JF, Borgström B, Allshire RC. Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere. *Genes Dev.* 2000 Apr 1;14(7):783-91.

Polizzi C, Clarke L. (1991). The chromatin structure of centromeres from fission yeast: differentiation of the central core that correlates with function. *J Cell Biol.* 112:191-201.

Przewloka MR, Zhang W, Costa P, Archambault V, D'Avino PP, Lilley KS, Laue ED, McAnish AD, Glover DM. (2007). Molecular analysis of core kinetochore composition and assembly in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 2: e478.

Przewloka MR, Venkei Z, Bolanos-Garcia VM, Debski J, Dadlez M, Glover DM. (2011). CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr Biol.* 21:399-405.

Reinhart BJ, Bartel DP. (2002). Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science.* 297:1831.

Rieder CL. (1979). Ribonucleoprotein staining of centrioles and kinetochores in newt lung cell spindles. *J Cell Biol.* 80:1-9

Saitoh S, Takahashi K, Yanagida M. (1997). Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation. *Cell.* 90:131-43.

Scprepanti E, De Antoni, Alushin GM, Petrovic A, Melis T, Nogales E, Musacchio A. (2011). Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer

kinetochore. *Curr Biol.* 21:391-8.

Shiomi T, Fukushima K, Suzuki N, Nakashima N, Noguchi E, Nishimoto T. (1998). Human dis3p, which binds to either GTP- or GDP-Ran, complements *Saccharomyces cerevisiae* dis3. *J Biochem.* 123:883-90.

Shiroiwa Y, Hayashi T, Fujita Y, Villar-Briones A, Ikai N, Takeda K, Ebe M, Yanagida M. (2011). Mis17 is a regulatory module of the Mis6-Mal2-Sim4 centromere complex that is required for the recruitment of CenH3/CENP-A in fission yeast. *PLoS One.* 6:e17761.

Shobuike T, Tatebayashi K, Tani T, Sugano S, Ikeda H. (2001). The dhp1(+) gene, encoding a putative nuclear 5' → 3' exoribonuclease, is required for proper chromosome segregation in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 15: 1326-33.

Staals RH, Bronkhorst AW, Schilders G, Slomovic S, Schuster G, Heck AJ, Raijmakers R, Pruijn GJ. (2010). Dis3-like 1: a novel exoribonuclease associated with the human exosome. *EMBO J.* 29:2358-67.

Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Moazed D, Grewal SI (2005) RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 152-157.

Takahashi K, Chen ES, Yanagida M. (2000). Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science.* 288:2215-9.

Tange Y, Hirata A, Niwa O. (2002). An evolutionarily conserved fission yeast protein, Ned1 implicated in normal nuclear morphology and chromosome stability, interacts with Dis3, Pim1/RCC1 and an essential nucleoporin. *J Cell Sci.* 115: 4375-85.

Tomecki R, Kristiansen MS, Lykke-Andersen S, Chlebowska A, Larsen KM, Szczensny RJ, Drazkowska K, Pastula A, Andersen JS, Stepień PP, Dziembowski A, Jensen TH. (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J.* 29:2342-57.

Toyoda Y, Furuta K, Goshima G, Nagao K, Takahashi K, Yanagida M. (2002). Requirement of chromatid cohesion proteins rad21/scc1 and mis4/scc2 for normal spindle-kinetochore interaction in fission yeast. *Curr Biol.* 12:347-58.

Umesono K, Toda T, Hayashi S, Yanagida M. (1983). Cell division cycle genes nda2 and nda3 of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* control microtubular organization and sensitivity to anti-mitotic benzimidazole compounds. *J Mol Biol.* 168:271-84.

Vanoosthuyse V, Hardwick KG. (2009). Overcoming inhibition in the spindle checkpoint. *Gene Dev.* 23:2799-805.

Volpe TA, Kidner C, Hall M, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. (2002). Regulation of heterochromatin silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science.* 297:1833-7.

Wang SW, Stevenson AL, Kearsey SE, Watt S and Bahler J. (2008). Global role for polyadenylation-assisted nuclear RNA degradation in posttranscriptional gene silencing. *M.C.B.* 28: 656-665

Win TZ, Draper S, Read RL, Pearce J, Norbury CJ and Wang SW. (2006). Requirement of fission yeast Cid14 in polyadenylation of rRNAs. *M.C.B.* 26: 1710-1721

Woods A, Sherwin T, Sasse R, MacRae TH, Baines AJ, et al. (1989) Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J Cell Sci* 93: 491-500.

Yamano H, Ishii K, Yanagida M. (1994). Phosphatase at the C-terminal cdc2 consensus and its potential role in cell cycle regulation. *EMBO J.* 13:5310-8

Yanagida M. Basic mechanism of eukaryotic chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:2005, 609-621.

Zhang K, Fisher T, Porter RL, Dhakshnamoorthy J, Zafall M, Zhou M, Veenstra T, Grewal SI. (2011). Ctr4/Suv39 and RNA quality control factors cooperate to trigger RNAi and suppress antisense RNA. *Science*. 331:1624-7

Zuo Y, Vincent HA, Zhang J, Wang Y, Deutscher MP, Malhortra A. (2006). Structural basis for processivity and single-strand specificity of RNaseII. *Mol Cell*. 24:149-56.

謝辞)

柳田充弘先生に心から感謝申し上げます。6年間、日々指導していただいた上に、一度は学位を取得することを諦めて研究から離れた私に、温かく再挑戦の機会を与えて下さり、本当に感謝しています。小児科医として働きながらも、どこかで臨床と基礎を結びつけた仕事出来るようにこれからも日々精進していきたいと考えています。本当にありがとうございました。今後ともご指導ご鞭撻お願い申し上げます。

近藤祥司博士、五島剛太博士に感謝申し上げます。近藤博士は4回生の私に研究の基礎や心構えを教えて下さいました。五島博士には多くの実験の手ほどきを頂いたと共に、研究生活の楽しさと厳しさを教えて頂きました。ありがとうございました。

清光智美博士に感謝申し上げます。清光博士には、本論文の作成についての指導をして頂きました。ありがとうございました。

川寄洋祐博士、木全諭宇博士、岩崎治博士、清光智美博士に感謝申し上げます。皆様と同じ部屋で研究生活を過ごせたことを今でも幸せに感じています。苦労を共にしながらも、たくさんの議論をし、研究室でも私生活でも楽しい学生生活を送らせて頂きました。ありがとうございました。

最後に私の家族に感謝申し上げます。仕事をしながらの学位取得に向けて、何度も諦めかけた私の背中を常に押し続けて応援してくれた妻、由季に感謝します。ありがとう。最後に、誰よりも長い学生生活を送った私を文句も言わずに支援し、温かく見守ってくれた両親に心から感謝申し上げます。ありがとうございました。

平成26年4月

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Hiroaki Murakami, Derek B. Goto, Takashi Toda, Ee Sin Chen, Shiv I. Grewal, Robert A. Martienssen, and Mitsuhiro Yanagida.

Ribonuclease Activity of Dis3 Is Required for Mitotic Progression and Provides a Possible Link between Heterochromatin and Kinetochore Function.

PLoS ONE, 2(3), 1-12, 2007